

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**GSK3- $\beta$  – ein Modulator proinflammatorischer Prozesse in  
primären humanen Colon Lamina Propria Fibroblasten und  
in Kolonepithelzellen**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Rebecca Anna Mayr**

**Regensburg, 2013**



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**GSK3- $\beta$  – ein Modulator proinflammatorischer Prozesse in  
primären humanen Colon Lamina Propria Fibroblasten und  
in Kolonepithelzellen**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Rebecca Anna Mayr**

**Regensburg, 2013**

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Florian Obermeier

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Stefan Fichtner-Feigl

Tag der mündlichen Prüfung:

11.06.2013

Für Franz

und für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungen.....	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Darms.....	1
1.2 Verschiedene Zellpopulationen der Darmwand.....	2
1.2.1 Kolonepithelzellen.....	2
1.2.2 Kolon Lamina Propria Fibroblasten.....	3
1.2.3 Lamina Propria Mononukleäre Zellen.....	4
1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	4
1.4 Immunologische Reaktionen im menschlichen Darm.....	6
1.4.1 Das Immunsystem des menschlichen Darms.....	6
1.4.1.1 Das angeborene und erworbenen Immunsystem.....	6
1.4.1.2 Toll-like Rezeptoren.....	7
1.4.2 Störungen intestinaler Immunreaktionen bei CED.....	10
1.4.2.1 Rolle der intestinalen mikrobiellen Flora.....	10
1.4.2.2 Rolle der T-Zell-Antwort bei CED.....	11
1.4.2.3 Rolle von Toll-like Rezeptoren und NOD-like Rezeptoren bei CED.....	11
1.5 Die Glykogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$ .....	13
1.5.1 Struktur und Regulation der GSK3- $\beta$ .....	13
1.5.2 Einfluss der GSK3- $\beta$ auf verschiedene Erkrankungen.....	14
1.5.3 GSK3- $\beta$ -abhängige Signalwege.....	15
1.5.4 Experimentelle Inhibition der GSK3- $\beta$ .....	17
2 Arbeitsziele.....	19
3 Material und Methoden.....	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Kultur und Stimulation primärer Fibroblasten.....	21
3.1.2 Kultur und Stimulation der Epithelzelllinie HT-29.....	22
3.1.3 Chemikalien.....	22
3.1.4 Verbrauchsmaterial.....	23
3.1.5 ELISA.....	24
3.1.6 Proteinbestimmung von Zelllysaten.....	24
3.1.7 Western Blot.....	24
3.1.8 Antikörper.....	25
3.1.8.1 primäre Antikörper.....	25
3.1.8.2 sekundäre Antikörper.....	25
3.1.9 Proteinbestimmung von Zellkernlysaten.....	25

3.1.10 DNA-Bindungsassays .....	26
3.1.11 Geräte.....	26
3.1.12 Nachweis und Eigenschaften der verwendeten primären Zellen .....	28
3.1.12.1 Gesamtbioptisylate.....	28
3.1.12.2 Kolonepithelzellen.....	28
3.1.12.3 Colon Lamina Propria Fibroblasten .....	29
3.1.12.4 Lamina Propria Mononukleäre Zellen.....	29
3.1.13 Nährmedien und Puffer .....	30
3.1.13.1 Nähr- und Stimulationsmedien .....	30
3.1.13.2 Allgemeine Puffer.....	30
3.2 Methoden .....	33
3.2.1 Arbeiten mit primären humanen Colon Lamina Propria Fibroblasten.....	33
3.2.1.1 Isolieren primärer humaner CLPF .....	33
3.2.1.2 Kultur primärer humaner CLPF .....	33
3.2.1.3 Einfrieren von primären humanen CLPF .....	34
3.2.1.4 Auftauen von primären humanen CLPF .....	34
3.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl.....	35
3.2.1.6 Stimulationsexperimente mit primären humanen CLPF.....	35
3.2.2 Arbeiten mit der Epithelzelllinie HT-29.....	36
3.2.3 Western Blot .....	37
3.2.3.1 Herstellung der Zelllysate.....	37
3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	38
3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
3.2.3.4 Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran.....	39
3.2.3.5 Detektion der Proteine mittels Antikörper .....	39
3.2.3.6 Strippen der Membranen .....	40
3.2.4 ELISA .....	40
3.2.5 DNA-Bindungs-Assay zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren .....	41
3.2.5.1 Herstellung der Zellkernlysate.....	41
3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellkernextrakten.....	42
3.2.5.3 Aktivitäts-Assay.....	42
3.2.4 Statistik .....	42
4 Ergebnisse .....	43
4.1 Proteinstatus und Grundaktivität der GSK3- $\beta$ in humanem Kolongewebe sowie in unstimulierten humanen intestinalen Zellpopulationen zeigen keine einheitliche Tendenz .....	43
4.1.1 GSK3- $\beta$ in Gesamtbioptisylaten.....	44
4.1.2 Die basale GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in primären humanen Kolonepithelzellen ist tendenziell erniedrigt in CED-Gewebe.....	45
4.1.3 Die GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in primären humanen Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) ist unabhängig von einer CED-Erkrankung.....	46

---

4.2 Modulation der Immunantwort der Epithelzelllinie HT-29 durch GSK3- $\beta$ Inhibition.....	48
4.2.1 Die Hemmung von GSK3- $\beta$ in HT-29-Zellen induziert verschiedene zytosolische Signalproteine mit proinflammatorischem Charakter .....	49
4.2.2 Die Hemmung von GSK3- $\beta$ in HT-29-Zellen induziert die Sekretion von IL-8 .....	51
4.3 Modulation der Immunantwort primärer humaner CLPF nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden.....	53
4.3.1 Die Phosphorylierung der GSK3- $\beta$ wird durch Stimulation mit verschiedenen TLR- Liganden nicht beeinflusst.....	54
4.3.2 Die Aktivierung verschiedener TLRs führt zu unterschiedlichen Zytokinantworten	55
4.4 Modulation der Immunantwort primärer humaner CLPF durch GSK3- $\beta$ Inhibition.....	57
4.4.1 LiCl-Inkubation induziert die Phosphorylierung von GSK3- $\beta$ in primären humanen CLPF von Kontroll- und CED-Patienten.....	57
4.4.2 Die Hemmung von GSK3- $\beta$ führt zu einer verminderten Sekretion von Interleukin-8 vorwiegend in MC-CLPF .....	59
4.4.3 Die Hemmung von GSK3- $\beta$ führt zu einer verminderten Sekretion von Interleukin-6 in stimulierten primären humanen CLPF .....	62
4.4.4 Einfluss der GSK3- $\beta$ -Hemmung auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren.....	65
5 Diskussion.....	67
6 Zusammenfassung .....	76
Anhang.....	78
Literaturverzeichnis .....	78
Publikationsliste.....	84
Danksagung .....	86
Erklärung.....	88



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau der Darmwand des Colons.....	2
Abbildung 1.2: Lokalisation wichtiger Toll-like Rezeptoren und ihre spezifischen Liganden .....	8
Abbildung 1.3: Mögliche Theorie für die differenzierte Entzündungsreaktion nach TLR-Aktivierung in gesundem und chronisch entzündetem intestinalem Gewebe.....	12
Abbildung 1.4: Struktur der GSK3- $\beta$ .....	14
Abbildung 1.5: Regulation der Produktion pro- bzw.- antiinflammatorischer Zytokine über die Aktivität von GSK3- $\beta$ .....	16
Abbildung 1.6: Hemmung von GSK3- $\beta$ durch LiCl.....	18
Abbildung 4.1: Vergleich der Phosphorylierung von GSK3- $\beta$ in Gesamtbiopsielysaten von Kontroll- und CED-Patienten mittels Western Blot.....	44
Abbildung 4.2: Vergleich der Phosphorylierung von GSK3- $\beta$ in primären Kolonepithelzellen von Kontroll- und CED-Patienten mittels Western Blot.....	45
Abbildung 4.3: Vergleich der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in unstimulierten primären humanen CLPF von Kontroll- und CED-Patienten mittels Western Blot.....	46
Abbildung 4.4: Vergleich der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in unstimulierten primären LPMZ von Kontroll- und CED-Patienten mittels Western Blot.....	47
Abbildung 4.5: Vergleich der Menge und Phosphorylierung verschiedener zytoplasmatischer Signalproteine in Lysaten von stimulierten HT-29-Zellen mittels Western Blot.....	50
Abbildung 4.6: IL-8 Konzentration in den Zellüberständen der stimulierten HT-29-Zellen bezogen auf die Werte der unstimulierten Ansätze.....	52
Abbildung 4.7: Menge und Phosphorylierung der GSK3- $\beta$ in CLPF nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden.....	54
Abbildung 4.8: IL-6 Sekretion nach Stimulation primärer humaner CLPF mit verschiedenen TLR-Liganden.....	55
Abbildung 4.9: IL-8 Sekretion nach Stimulation primärer humaner CLPF mit verschiedenen TLR-Liganden.....	56
Abbildung 4.10: Vergleich des Proteinstatus und Phosphorylierungsgrads der GSK3- $\beta$ und des Status von pERK in stimulierten primären humanen CLPF mittels Western Blot.....	58

<b>Abbildung 4.11: Einfluss der GSK3-<math>\beta</math>-Inhibition auf die Interleukin-8 Sekretion von Kontroll-CLPF.....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 4.12: Einfluss der GSK3-<math>\beta</math>-Inhibition auf die Interleukin-8 Sekretion von CU-CLPF.....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 4.13: Einfluss der GSK3-<math>\beta</math>-Inhibition auf die Interleukin-8 Sekretion von MC-CLPF.....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 4.14: Einfluss der GSK3-<math>\beta</math>-Inhibition auf die Interleukin-6 Sekretion von Kontroll-CLPF.....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 4.15: Einfluss der GSK3-<math>\beta</math>-Inhibition auf die Interleukin-6 Sekretion von CU-CLPF.....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 4.16: Einfluss der GSK3-<math>\beta</math>-Inhibition auf die Interleukin-6 Sekretion von MC-CLPF.....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 4.17: Einfluss der GSK3-<math>\beta</math>-Inhibition auf die NK-<math>\kappa</math>B-Aktivität.....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 4.18: Einfluss der GSK3-<math>\beta</math>-Inhibition auf die CREB-Aktivität.....</b>	<b>66</b>

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3.1: Primäre Antikörper.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 3.2: Sekundäre Antikörper.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 3.3: Gesamtbioptielysate.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 3.4: Kolonepithelzellen.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 3.5: Colon Lamina Propria Fibroblasten.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabelle 3.6: Lamina Propria Mononukleäre Zellen.....</b>	<b>29</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
aqua bidest.	aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninic Acid, Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
ca.	circa
CARD	caspase-recruitment domain
CBP	CREB-bindendes Protein
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CgG	unmethyliertes Cytosin-Guanosin-Motiv in bakterieller DNA
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CLPF	Colon Lamina Propria Fibroblasten
CREB	cAMP response element-binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
e.	entzündet/ entzündetes Gewebe
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest
ERK	extracellular signal-related kinase
FCS	fetal calf serum, Fötales Kälberserum
Fi	Fistel bei Morbus Crohn
GALT	gut-associated lymphatic tissue
GSK3- $\beta$	Glykogen Synthase Kinase 3- $\beta$
h	Stunde(n)
HB	Hypotonischer Puffer
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxydase)
i.d.R.	in der Regel
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton

---

KEZ	Kolonepithelzellen
L	Liter
LEF	lymphoid enhancer factor
LiCl	Lithiumchlorid
LPMZ	Lamina Propria Mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
n	Anzahl der Experimente
n.e.	nicht entzündet/ nicht entzündetes Gewebe
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodeoxynukleotide
p	statistischer P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam2Cys	S-[2,3-bis(palmitoyloxy)propyl]cysteine
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzsäure)
pg	Picogramm
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIB	Phosphatase-Inhibitor-Puffer
PNPP	Para-Nitrophenylphosphat
PPR	Pattern Recognition Receptor
RIPA	radio immunoprecipitation assay
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute

---

RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulphat bzw. Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
TBST	Tris-Buffered Saline mit Tween 20
TCF	T-cell factor, T-Zell Faktor
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Darms

Der menschliche Darm stellt eine der größten Kontaktflächen des menschlichen Körpers zur Umwelt dar. Er besitzt dadurch – neben den Aufgaben der Nährstoff- und Wasserresorption und vielfältigen weiteren Stoffwechselfunktionen – eine entscheidende Funktion in der immunologischen Auseinandersetzung des menschlichen Immunsystems mit zahlreichen pathogenen Keimen, Nahrungsmittelantigenen und Verdauungsenzymen.

Der Schichtaufbau von Dün- und Dickdarm ist grundsätzlich sehr ähnlich. Im Dünndarm ist die Oberfläche durch Faltenbildung stark vergrößert. Hier finden sich neben den großen Kerckring-Falten, die bis zu 10 mm hoch sein können, auch Zotten und Krypten, wohingegen der Dickdarm nur tiefe Krypten besitzt.<sup>1</sup>

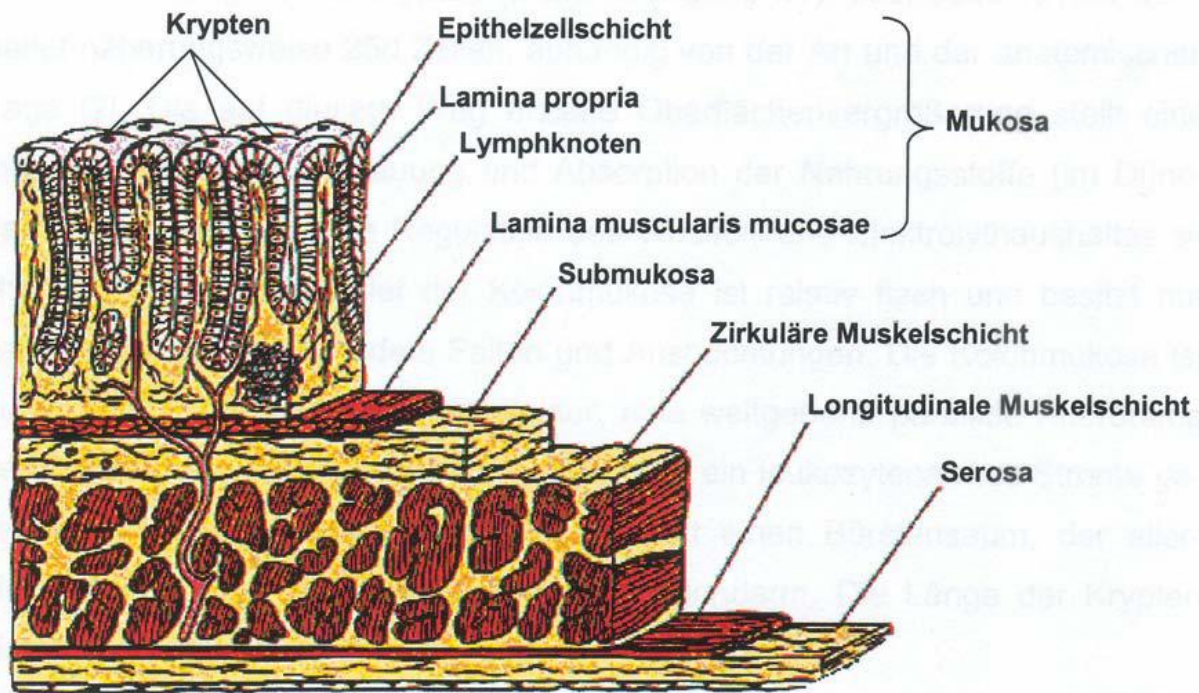
Der Aufbau des menschlichen Darms besteht grundsätzlich aus drei konzentrisch angeordneten Schichten (Abbildung 1.1):

Die innerste und somit direkt an das Darmlumen grenzende Schicht ist die *Mukosa*. Sie besteht aus einer dünnen, einschichtigen Epithelzellschicht, der *Lamina epithelialis mucosae*, die eine wichtige Barrierschicht darstellt. Daran grenzt die *Lamina propria mucosae*, eine lockere Bindegewebsschicht, die reich an Abwehrzellen sowie an Blut- und Lymphkapillaren ist. Darunter liegt eine dünne muskuläre Schicht, die *Lamina muscularis mucosae*.

An die *Mukosa* grenzt als nächste Schicht eine Bindegewebsschicht, die *Submukosa*. Hier finden sich scherengitterartig angeordnete Kollagenfasern, die eine Ausdehnung des Darms ermöglichen, sowie besonders viele Blut- und Lymphgefäße.

Der *Submukosa* schließt sich die *Muskularis* an. Sie besteht aus einer inneren Ring- und äußeren Längsmuskelschicht.

Da der Darm bis auf Anteile des Duodenums intraperitoneal gelegen ist, wird die Darmwand durch die *Serosa*, eine Bindegewebsschicht mit Peritonealepithel, begrenzt.<sup>1</sup>



**Abbildung 1.1: Aufbau der Darmwand des Colons.** [adaptiert nach 2]<sup>2</sup>

## 1.2 Verschiedene Zellpopulationen der Darmwand

Aufgrund der vielfältigen Funktionen und des komplexen Aufbaus der Darmwand, findet sich im menschlichen Darm ein sehr breites Spektrum an unterschiedlichen Zellpopulationen, die sich sowohl phänotypisch als auch in ihren Funktionen stark voneinander unterscheiden. Im Folgenden werden Zellpopulationen aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet und untersucht wurden.

### 1.2.1 Kolonepithelzellen

Die Oberfläche des Darms ist durch eine Epithelschicht ausgekleidet, die eine physiologische Barriere zwischen dem Darmlumen und der intestinalen Gewebe darstellt. Spezielle Zellkontakte zwischen den Kolonepithelzellen, die *tight junctions*, dichten diese Epithelschicht zusätzlich ab.

Die Hauptfunktion der Kolonepithelzellen im menschlichen Darm besteht vor allem in der Resorption von Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen aus dem Nahrungsbrei. Kolonepithelzellen besitzen eine selektive Barrierefunktion und stehen ständig in



Kontakt mit verschiedenen pathogenen Keimen, der intestinalen Flora, Nahrungsmittelbestandteilen und ggf. mit verschiedenen Medikamenten. Darüber hinaus produzieren sie Muzine, die eine Schleimschicht bilden und den Darm zusätzlich vor mechanischen und chemischen Reizen schützen. Die Kolonepithelzellen sind daher für die mukosalen immunologischen Prozesse von entscheidender Bedeutung.<sup>3</sup>

### **1.2.2 Kolon Lamina Propria Fibroblasten**

Fibroblasten sind langlebige, mesenchymale Zellen, die in allen menschlichen Organen und Geweben vorgefunden werden. Sie sind wichtige Strukturgeber und besitzen Stützfunktion. Eine entscheidende Rolle spielen die Fibroblasten außerdem bei der Wundheilung und Entzündungsreaktion.<sup>4</sup> Hierbei kommt es zur Migration, Proliferation und Produktion von extrazellulärer Matrix.<sup>5</sup> Bei der normalen Wundheilung werden die Fibroblasten aktiviert und verändern daraufhin ihren Phänotyp. Sie wandern anschließend durch wiederkehrendes Anheften und Ablösen von Adhäsionsmolekülen auf ein chemotaktisches Signal hin in das Granulationsgewebe ein.<sup>6</sup>

In dieser Arbeit wurde der größte Teil der Versuche mit primären humanen Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) aus der Lamina propria des Darms von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und von Kontroll-Patienten durchgeführt.

Für eine normale Wundheilung nach inflammatorischen Prozessen ist die Aktivierung von CLPF dringend notwendig. Eine dauerhafte Aktivierung der CLPF geht allerdings einher mit übermäßiger Kollagen-Akkumulation und Fibrose. Es lassen sich außerdem Unterschiede in der Funktionsfähigkeit der Fibroblasten aus gesundem und CED-Gewebe nachweisen. So besitzen CLPF aus CED-Gewebe eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit im Vergleich zu gesundem Gewebe.<sup>7</sup> Als Antwort auf Entzündungsreaktionen und nach Stimulation wird bei CLPF eine Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) beobachtet.<sup>8</sup>

### 1.2.3 Lamina Propria Mononukleäre Zellen

Lymphozyten und Monozyten werden wegen ihres nicht-segmentierten Zellkerns im klinischen Sprachgebrauch als „mononukleäre Zellen“ zusammengefasst. Vom histologischen Erscheinungsbild unterscheiden sie sich v. a. in ihrer Größe. In der lockeren Bindegewebsschicht der Lamina propria der Mukosa des menschlichen Darms findet man zahlreiche lockere Ansammlungen von lymphatischen Zellen (sog. GALT – „gut-associated lymphatic tissue“).<sup>1</sup> Das Vorhandensein von Lamina Propria Mononukleären Zellen (LPMZ) ist essentiell für die basale Aktivierung des Immunsystems. Eine entscheidende Funktion ist außerdem die Induktion von Toleranzmechanismen. Bei Entzündungsreaktionen kommt es zusätzlich zu einer Einwanderung von Immunzellen und Proliferation. LPMZ sind somit sowohl für die Aufrechterhaltung einer Homöostase als auch für Entzündungsprozesse bedeutsam.<sup>9</sup>

## 1.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zählen der Morbus Crohn und die Colitis Ulcerosa. Beide betreffen hauptsächlich junge Menschen im Alter von 20 bis 40 Jahren. Nur selten erkranken Kinder oder ältere Menschen. Der Krankheitsverlauf erstreckt sich jedoch meist über Jahrzehnte.

Die Ätiologie der CED ist bisher noch unklar. Weiße Bevölkerungsgruppen, besonders (Nord-) Europäer und Amerikaner erkranken deutlich häufiger als Dunkelhäutige. Es werden allerdings familiäre Häufungen und genetische Prädispositionen beobachtet. Insbesondere beim Morbus Crohn lassen sich häufig Mutationen im NOD2-Gen (nucleotide-binding oligomerization domain) auf Chromosom 16 nachweisen. Hierbei finden sich in dieser Region genetische Varianten. Derartige Mutationen auf NOD2 liegen bei etwa 30 bis 50 % der Morbus Crohn-Patienten vor. Das NOD2-Gen ist u.a. für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zuständig.<sup>10,11,12</sup> Dies lässt auf eine Störung der Entzündungsreaktion schließen. In den letzten Jahren wurden neben NOD2 noch weitere Gen-Varianten beschrieben, die mit Morbus Crohn (z.B. IL-23R, DLG5, TLR9)<sup>13,14</sup> aber auch mit Colitis Ulcerosa assoziiert sind.<sup>15</sup> Grundsätzlich geht man davon aus, dass die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen auf

einer inadäquaten Aktivierung des Immunsystems, getriggert durch bakterielle Antigene der intestinalen Flora, beruht.<sup>16</sup>

Ein Zusammenhang wurde auch für Rauchverhalten und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt. So erkrankten Raucher überdurchschnittlich häufig an Morbus Crohn und erleiden häufiger Rezidive, wohingegen das Rauchen bei Colitis Ulcerosa eher einen protektiven Faktor darstellt.<sup>17,18,19</sup>

Bei CED handelt es sich daher um multifaktorielle Krankheitsbilder, deren Entstehung sowohl durch genetische als auch durch Umweltfaktoren bestimmt wird.

Die Leitsymptome des Morbus Crohn sind (selten blutige) Durchfälle und Abdominalschmerzen, die meist kolikartigen Charakter haben. Häufig können druckschmerzhaft Resistenzen v.a. im rechten Unterbauch getastet werden. Die häufigste Lokalisation des Morbus Crohn ist das terminale Ileum und das Kolon. Grundsätzlich kann aber jede Stelle des Verdauungstrakts vom Mund bis zum Anus betroffen sein. Die Ausbreitung erfolgt diskontinuierlich mit zwischengeschalteten nicht-betroffenen Darmabschnitten (sog. „*skip lesions*“). Hierbei handelt es sich um eine segmentale, transmurale Entzündung, die eine ödematöse Schwellung und fibrotische Verdickung der Darmwand zur Folge hat, wodurch es zu Stenosen der Darmwand kommen kann. Eine häufige Komplikation beim Morbus Crohn ist die Fistelbildung. Wegweisend für die Diagnose Morbus Crohn sind außerdem Epitheloidzellgranulome, mehrkernige Riesenzellen in der Histologie und eine Vergrößerung der regionalen Lymphknoten.<sup>20,21</sup>

Die Colitis Ulcerosa ist hingegen durch eher schleimig-blutige Durchfälle charakterisiert. Auch hier gehören Abdominalschmerzen zu den Leitsymptomen. Die Colitis Ulcerosa beginnt meist im distalen Kolon bzw. im Rektum und breitet sich kontinuierlich nach proximal aus. Eine Beteiligung des Ileums ist selten und wird dann als „*backwash Ileitis*“ bezeichnet. Im Gegensatz zu Morbus Crohn sind bei Colitis Ulcerosa nur Mukosa und Submukosa betroffen. Charakteristisch sind hierbei sog. Kryptenabszesse (Granulozyten-Ansammlungen in den Krypten). Bei der Koloskopie kommt es häufig zu Kontaktblutungen. Aufgrund des Hausternschwunds imponiert im Röntgenbild das sog. „Fahrradschlauchphänomen“. Eine schwerwiegende Komplikation der Colitis Ulcerosa ist das toxische Megakolon. Die Colitis Ulcerosa geht außerdem mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Karzinome einher.<sup>20,21</sup>

Sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis Ulcerosa kann es zu verschiedenen extraintestinalen Manifestationen, wie z.B. Arthralgien, Ophthalmopathien oder Hauterscheinungen kommen.<sup>20,21</sup>

## **1.4 Immunologische Reaktionen im menschlichen Darm**

### **1.4.1 Das Immunsystem des menschlichen Darms**

Aufgrund der großen Kontaktfläche zur Umwelt und dem ständigen Auseinandersetzen mit körperfremden Substanzen und Keimen über den Nahrungsbrei ist ein ausgewogenes und gesundes Immunsystem im menschlichen Darm dringend notwendig. Es muss zum einen den Körper vor dem Eindringen pathogener Keime schützen, zum anderen aber überschießende Entzündungs- und Immunreaktionen vermeiden. Im Idealfall stehen proinflammatorische und antiinflammatorische Prozesse im Darm in einem gesunden Gleichgewicht. Bei CED scheint dieses Gleichgewicht jedoch gestört zu sein.

#### **1.4.1.1 Das angeborene und erworbenen Immunsystem**

Das menschliche Immunsystem wird grundsätzlich in zwei große Gruppen eingeteilt - das angeborene und das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ist unspezifisch und somit gegen alle möglicherweise gefährlichen Keime gerichtet. Dies gewährleistet ein schnelles Eingreifen. Das erworbene Immunsystem setzt sich spezifisch mit bestimmten Krankheitserregern auseinander. Voraussetzung ist hierbei, dass der Körper mit diesen Keimen bereits vorher Kontakt hatte. Dadurch entsteht ein Antigen-spezifisches immunologisches Gedächtnis. Die Immunreaktionen des erworbenen Immunsystems setzen allerdings zeitlich verzögert ein.

Bevor fremde Keime über den Darm in den menschlichen Körper eindringen oder in irgendeiner Weise schaden können, müssen sie mehrere Barrieren überwinden. Hierzu zählen verschiedenste natürliche Hindernisse. Diese umfassen chemische (saurer Magensaft) und physikalische Barrieren (durch *tight junctions* abgedichtete Epithelzellschicht, Mukus der intestinalen Schleimhaut). Auch bestimmte Enzyme und Proteine, wie z.B. Lysozym oder Defensine, gehören zu diesen ersten Hürden.

Sollte es pathogenen Eindringlingen gelingen, diese Hindernisse zu überwinden, werden sie in der Regel vom Komplementsystem, von phagozytierenden Zellen oder von natürlichen Killerzellen neutralisiert. An zellvermittelten immunologischen Vorgängen im menschlichen Darm sind hauptsächlich Immunzellen des sog. GALT (siehe 1.2.3) beteiligt.

Kommt es trotz dieser Schutzmechanismen zum Eindringen von pathogenen Organismen, so kann das menschliche Immunsystem bestimmte hochkonservative Muster, sog. PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) (z.B. Oberflächenantigene oder DNA-Motive pathogener Keime) erkennen, die spezifisch bei Mikroorganismen vorhanden sind.

#### 1.4.1.2 Toll-like Rezeptoren

Von besonderem Interesse hinsichtlich des Erkennens von Keimen und der Einleitung einer adäquaten Immunreaktion sind die Toll-like Rezeptoren. Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Typ 1 Transmembranrezeptoren<sup>22</sup> und zählen zur Gruppe der PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Sie sind somit in der Lage PAMPs zu erkennen. Nach der Identifizierung dieser PAMPs kommt es über TLRs zur Aktivierung von Signalwegen, die die Expression bestimmter Gene beeinflussen. Es kommt außerdem zur Ausschüttung von Mediatoren (Zytokine und Chemokine), die im weiteren Verlauf bestimmte Immunzellen aktivieren (B-Lymphozyten, zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen).<sup>23</sup>

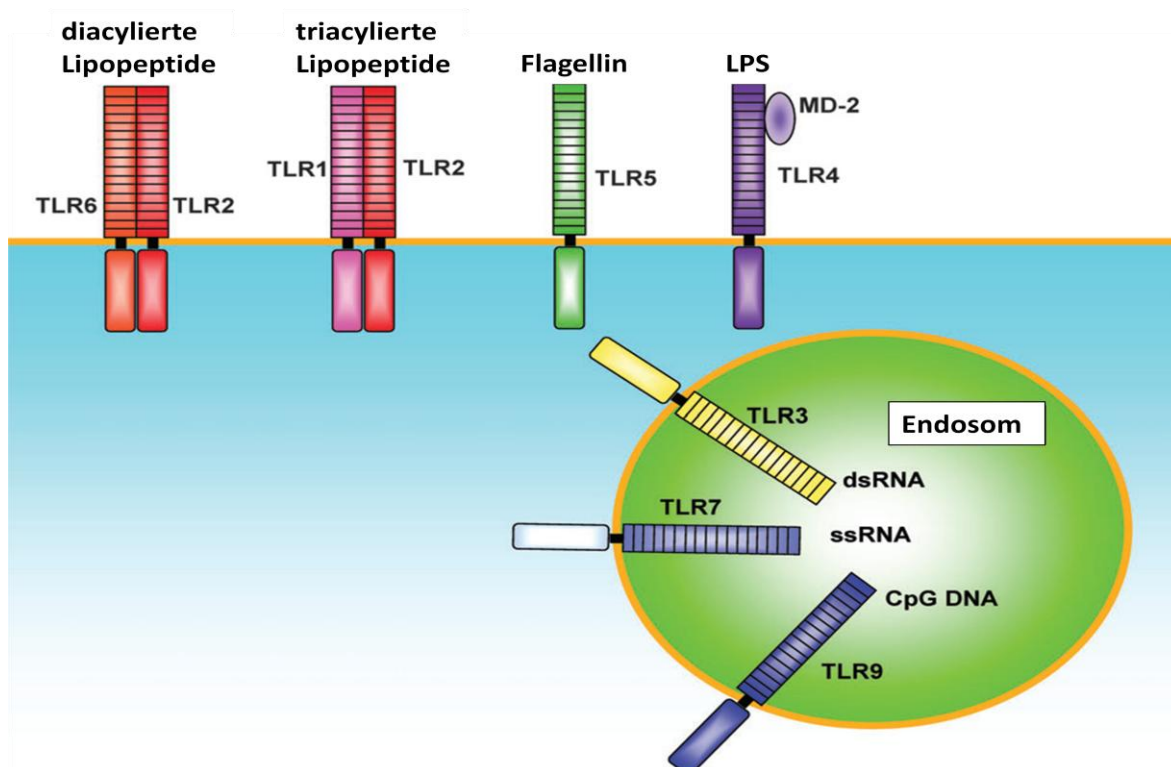
TLRs selbst gehören zum angeborenen Immunsystem. Im weiteren Verlauf der Immunreaktion kommt es allerdings zur Aktivierung und Entwicklung Antigen-spezifischer Immunität im Rahmen des erworbenen Immunsystems.<sup>24</sup>

Bisher wurden 10 Mitglieder der TLR-Familie beim Menschen und 13 Mitglieder bei Mäusen identifiziert.<sup>25</sup> Man findet sie vor allem auf Makrophagen, Monozyten und Dendritischen Zellen, aber auch auf B-Lymphozyten, best. T-Lymphozyten, Epithelzellen und Fibroblasten.<sup>24</sup>

TLRs werden aufgrund der Ähnlichkeit ihrer extrazellulären Domäne mit Rezeptoren der IL-1-Familie zu einer Toll/IL-1-Rezeptor Superfamilie zusammengefasst. Diese Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR) Domäne ist wichtig für die Signalübertragung. Die Stimulation von Rezeptoren mit der TIR Domäne führt über die Aktivierung mehrerer

Kinasen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*).<sup>26</sup> In ihrer extrazellulären Domäne gibt es allerdings deutliche Unterschiede. IL-1-Rezeptoren besitzen Immunglobulin-ähnliche Domänen, während die extrazelluläre Domäne der TLRs hier Leucin-reiche Motive aufweisen.<sup>24, 27</sup>

Innerhalb der Zelle sind die TLRs an unterschiedlichen Orten lokalisiert. An der Zelloberfläche findet man z.B. TLR1, TLR2 und TLR4, während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär, z.B. an Endosomen vorkommen.<sup>24</sup> Die einzelnen TLRs sprechen auf verschiedene PAMPs an. So erkennen z.B. die eng verwandten TLRs TLR1, TLR2 und TLR6 bestimmte Lipoproteine, wohingegen die intrazellulär gelegenen TLRs TLR7, TLR8 und TLR9 als Sensor für bestimmte Nukleinsäuren dienen.<sup>24</sup> (Abbildung 1.2)



**Abbildung 1.2: Lokalisation wichtiger Toll-like Rezeptoren und ihre spezifischen Liganden.** [adaptiert nach 24]

In dieser Arbeit wurden vor allem vier dieser Toll-like Rezeptoren (TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9) in Stimulationsexperimenten betrachtet. Diese werden im Folgenden genauer beschrieben.

Von allen TLRs scheint TLR2 das breiteste Spektrum an pathogenen Mustern (PAMPs) zu erkennen. Hierzu zählen unter anderem Lipopeptide und Lipoproteine von verschiedenen Pathogenen<sup>28</sup>, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure von gram-positiven Bakterien<sup>29</sup>, Lipoarabinomannan von Mykobakterien<sup>30</sup> und weitere spezielle PAMPs bestimmter Bakterien, Parasiten und Pilze.<sup>31,32,33,34,35</sup>

In letzter Zeit steht die Vielseitigkeit des TLR2 Rezeptors hinsichtlich seiner Liganden allerdings in der Kritik.<sup>36</sup> Gesichert ist jedoch das starke Ansprechen auf Lipopeptide und Lipoproteine.<sup>36</sup>

TLR2 bildet mit den strukturell eng verwandten TLR1 und TLR6 an der Zelloberfläche Heterodimere. Diese Dimere scheinen spezifisch zwischen triacylierten (TLR1/TLR2) und diacylierten (TLR2/TLR6) Liganden unterscheiden zu können. So wurde nachgewiesen, dass TLR6-defiziente Makrophagen nicht auf diacylierte, trotzdem aber auf triacylierte Lipopeptide reagieren.<sup>37</sup> Analoge Ergebnisse erhielt man für TLR1-defiziente Makrophagen, bei denen die Immunantwort auf triacylierte Lipoproteine fehlte.<sup>38</sup>

TLR4 ist ein Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien. Zur LPS-Bindung an TLR4 werden noch weitere Moleküle benötigt. Zunächst bildet LPS einen Komplex mit dem LPS-bindenden Protein, das im Serum vorkommt. Dieser Komplex wird von CD14 erkannt. CD14 ist ein Glykoprotein, das über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden ist und vor allem auf Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten vorkommt. Nach LPS-Stimulation wird eine räumliche Enge von CD14 und TLR4 beobachtet, was eine Interaktion vermuten lässt.<sup>39,35</sup> Eine wichtige Komponente des TLR4 für die LPS-Erkennung ist das *myeloid differentiation protein 2* (MD-2)<sup>40</sup>, das für die LPS-Bindung über die Lipidkomponente Lipid A verantwortlich ist.<sup>41</sup>

Auch körpereigene Produkte, wie Fibronektin<sup>42</sup>, Abbauprodukte der Hyaluronsäure<sup>43</sup> und Hitzeschockproteine (Hsp60 und Hsp70)<sup>44,45</sup> scheinen Liganden von TLR4 zu sein.

TLR5 gilt als Sensor für Flagellin, einem monomeren Bestandteil der bakteriellen Flagellen, die sowohl bei vielen gram-negativen als auch bei gram-positiven Bakterien vorkommen.<sup>46</sup> Flagellin ist essentiell für die bakterielle Mobilität. An

Epithelzellen wurde beobachtet, dass TLR5 an der basolateralen, nicht aber an der apikalen Zellmembran lokalisiert ist.<sup>47</sup>

TLR9 ist ein intrazellulär gelegener Rezeptor, der spezifisch durch das bakterielle DNA-Motiv CpG aktiviert wird. Die bakterielle DNA enthält zahlreiche unmethylierte Cytosin-Guanosin-Motive, wohingegen diese Basensequenz in der menschlichen DNA deutlich seltener vorkommt und die Cytosin-Reste meist stark methyliert sind.<sup>48</sup>

CpG-Oligodeoxynukleotide (ODN) können in Experimenten mit Mäusen auf direktem Weg Antigen-präsentierende Zellen, wie Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten aktivieren. Daraufhin kommt es zu einer erhöhten Antigen-Präsentation und einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, IL-12 und Tumor Nekrose Faktor (TNF), was zu einer starken Th1-Antwort führt.<sup>49</sup>

Die TLR9-Stimulation durch bakterielle CpG-Motive scheint entscheidend das Fortschreiten einer bestehenden Colitis zu beeinflussen. (siehe 1.4.2.3)

#### **1.4.2 Störungen intestinaler Immunreaktionen bei CED**

Die vorherrschende Theorie zur Pathogenese einer CED basiert auf der Störung einer ausgewogenen Immunreaktion und einer inadäquaten Interaktion mit bestimmten Faktoren der intestinalen mikrobiellen Flora.<sup>50</sup>

Die Entzündungsreaktion im menschlichen Darm beruht grundsätzlich auf vier Komponenten: Triggerfaktoren (z.B. PAMPs) aktivieren bestimmte Sensoren (z.B. TLRs). Dadurch kommt es zur Ausschüttung von Mediatoren (Zytokine und Chemokine), die letztendlich Effektoren aktivieren (z.B. B-Lymphozyten, zytotoxische T-Zellen oder T-Helferzellen). Bestimmte dieser Effektoren (z.B. T-Helferzellen) produzieren ebenfalls Zytokine (Mediatoren). Bei CED scheint der Ablauf einer kontrollierten Entzündungsreaktion gestört zu sein, wodurch es zu einer chronisch persistierenden Entzündung kommt.<sup>50</sup>

##### **1.4.2.1 Rolle der intestinalen mikrobiellen Flora**

Die intestinale mikrobielle Flora des Menschen, die sich aus über  $10^{14}$  Mikroorganismen<sup>51</sup> zusammensetzt, scheint ein wichtiger Triggerfaktor bei CED zu sein.<sup>52</sup> Versuche mit IL-2-defizienten Mäuse zeigten, dass bereits eine normale



bakterielle Flora (ohne Pathogene) eine schwere Colitis bei einem dysregulierten Immunsystem auslösen kann.<sup>53</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden für IL-10-defiziente Mäuse unter denselben Bedingungen beschrieben.<sup>54</sup>

#### 1.4.2.2 Rolle der T-Zell-Antwort bei CED

An der Pathogenese und dem Fortschreiten von CED scheinen auch T-Zellen maßgeblich beteiligt zu sein. So wurde in mehreren CED-Tiermodellen eine erhöhte Infiltration durch Th1-Zellen (identifiziert anhand der Sekretion von Interferon- $\gamma$ ) und Th17-Zellen (identifiziert durch die Sekretion von IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22) beobachtet.<sup>55</sup> Bei CED besteht außerdem eine Dysbalance zwischen den Zytokinen IL-6, IL-12 (Th1), IL-21 (Th17), IL-23 (Th17) und TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*), die zur Differenzierung und Aktivierung bestimmter T-Zellen beiträgt.<sup>50,56</sup> So wurde auch nachgewiesen, dass eine Neutralisation von IL-6 und IL-23 in zahlreichen Tiermodellen vor einer Enterokolitis schützen kann.<sup>50</sup>

#### 1.4.2.3 Rolle von Toll-like Rezeptoren und NOD-like Rezeptoren bei CED

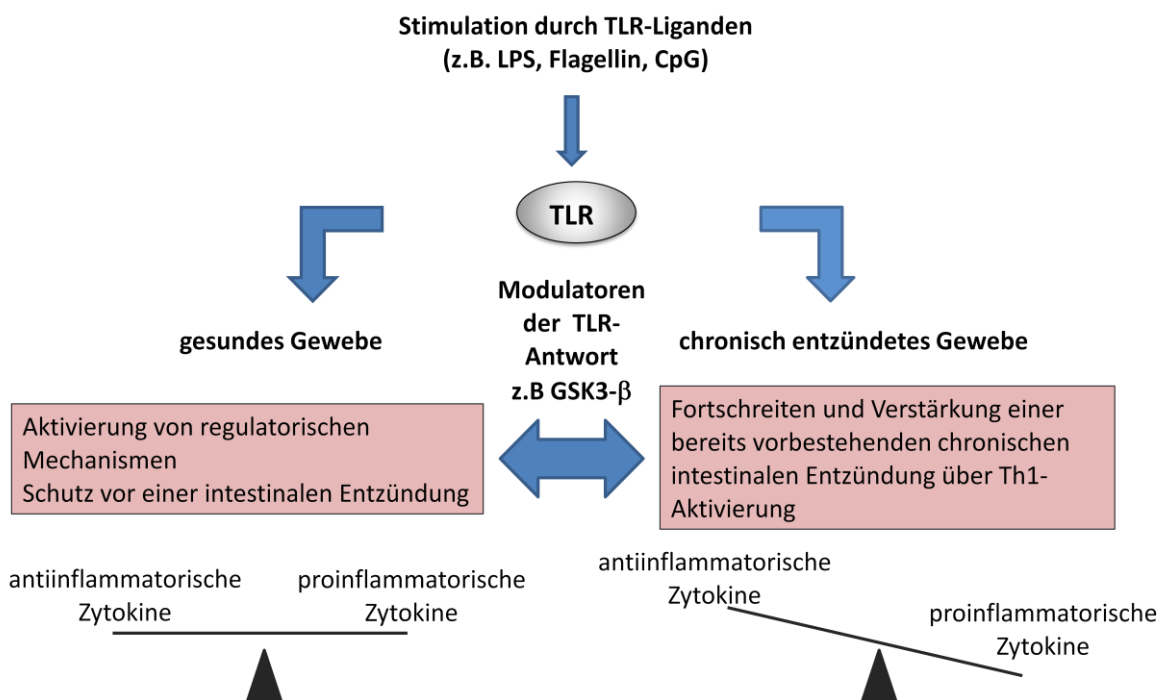
Obwohl die mikrobielle Flora zur Pathogenese und dem Fortschreiten einer CED beiträgt, scheint die Aktivierung von PPRs wie NOD2 und TLRs einen protektiven Effekt zu haben.<sup>50</sup>

NOD2 ist ein zytosolischer Rezeptor, der Muramyl Dipeptid (ein Peptidoglykan-Bestandteil von gram-positiven und gram-negativen Bakterien) erkennt und über NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu einer proinflammatorischen und antibakteriellen Entzündungsreaktion führt. Mutationen im NOD2-Gen sind assoziiert mit MC (siehe 1.3). Nach neuesten Erkenntnissen scheint NOD2 auch eine Autophagie herbeizuführen.<sup>57</sup> Somit könnte eine spezifische Immunität gegen bestimmte Bakterien entwickelt werden, um effektiv gegen diese Bakterien vorgehen zu können.

Eine TLR9-Aktivierung durch CpG-Motive bakterieller DNA in gesundem Gewebe schützt prophylaktisch vor einer Entzündung.<sup>58,59</sup> Stimulation von TLR9 in intestinalem Gewebe mit einer bereits bestehenden chronischen Entzündung führt hingegen über Th1-Aktivierung zu einer zusätzlichen Verstärkung der Entzündungsreaktion.<sup>60,61,62</sup> Die Gründe für diesen kontroversen Effekt der TLR9-

Stimulation zwischen gesundem und chronisch entzündetem Gewebe sind bisher noch unbekannt. Auch für andere TLR-Liganden wurden derartige paradoxe Effekte beschrieben.<sup>62</sup> Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine TLR9-Stimulation an der basolateralen Epithelzellseite (im Gegensatz zu einem protektiven Effekt bei apikaler TLR9-Stimulation) eine deutlich stärkere NF- $\kappa$ B-Aktivierung und Entzündungsreaktion zur Folge hat.<sup>62,63</sup> Da bei CED die Epithelzellbarriere gestört ist, könnte auch dieser Effekt für ein Fortschreiten der CED mitverantwortlich sein.

Der Grund für diese paradoxen Effekte liegt möglicherweise in einer differenzierten Regulation des Signalwegs nach TLR-Stimulation. Ein mögliches Regulationsprotein, das die TLR-Antwort entweder in Richtung einer schweren Entzündungsreaktion (bei vorbestehender chronischen Entzündung) oder in Richtung einer moderaten Toleranzreaktion (in gesundem Gewebe) lenkt, könnte die Glykogen-Synthase-Kinase 3- $\beta$  (GSK3- $\beta$ ) sein.<sup>62</sup> (Abbildung 1.3)



**Abbildung 1.3: Mögliche Theorie für die differenzierte Entzündungsreaktion nach TLR-Aktivierung in gesundem und chronisch entzündetem intestinale Gewebe.** GSK3- $\beta$  könnte ein möglicher Modulator der Entzündungsreaktion nach TLR-Stimulation sein, der die Immunreaktion je nach vorbestehendem Entzündungsstatus in Richtung einer schweren Entzündung (bei CED) oder in Richtung einer moderaten Toleranzreaktion (in gesundem Gewebe) lenkt. [adaptiert nach 62]

## 1.5 Die Glykogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$

Die Glykogen-Synthase-Kinase-3- $\beta$  (GSK3- $\beta$ ) ist ein sehr vielfältiges Enzym, das erstmals in Zusammenhang mit dem Glukose-Metabolismus beschrieben wurde und nach dem hierbei entscheidenden Substrat, der Glykogen-Synthase, die durch GSK3- $\beta$  phosphoryliert wird, benannt wurde. In den letzten Jahren trat die GSK3- $\beta$  zunehmend in den Fokus experimenteller Forschung und wurde in Hinblick auf zahlreiche Vorgänge und Pathomechanismen unabhängig vom Glukose-Metabolismus beleuchtet. Hierbei stellte sich heraus, dass die GSK3- $\beta$  Schlüsselenzym und Schnittstelle mehrerer Signalwege ist und über 40 verschiedene Substrate phosphorylieren und damit regulieren kann.<sup>64</sup> GSK3- $\beta$ -abhängige Mechanismen scheinen sowohl für die primäre Pathogenese als auch für das Fortschreiten eines breiten Spektrums an Erkrankungen verantwortlich zu sein (siehe 1.5.2).

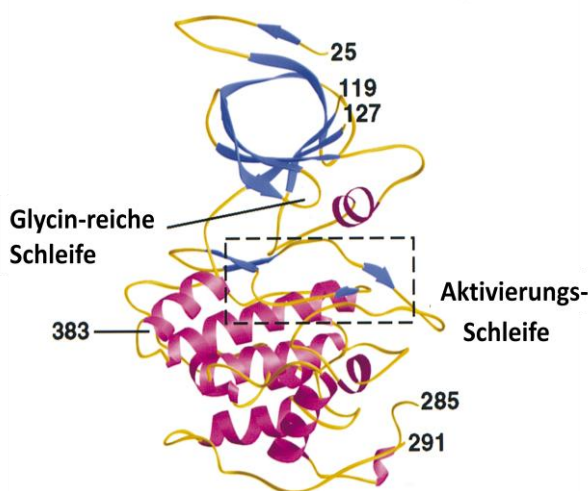
### 1.5.1 Struktur und Regulation der GSK3- $\beta$

Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) ist eine ubiquitär vorhandene, konstitutiv aktive Serin/Threonin-Kinase. In Säugetieren wurden zwei Isoformen identifiziert, GSK3- $\alpha$  und GSK3- $\beta$ , die durch unterschiedliche Gene kodiert werden.<sup>65</sup> Trotzdem sind diese zwei Isoformen in ihrer Kinasedomäne bis zu 98% homolog. Am C-Terminus stimmen sie allerdings nur zu 36% überein.<sup>65</sup> Diese Unterschiede in der Homologie sind auch dafür ausschlaggebend, dass die zwei Isoformen für unterschiedliche Prozesse verantwortlich sind und sich gegenseitig nicht ersetzen können. So führt ein homozygoter Verlust der GSK3- $\beta$  bei intakter GSK3- $\alpha$  im Tierexperiment mit GSK3- $\beta$ -knockout-Mäusen zu embryonaler Letalität aufgrund einer hämorrhagischen Leberdegeneration.<sup>66</sup> GSK3- $\alpha$  kann also den Verlust von GSK3- $\beta$  nicht kompensieren.

Eine Besonderheit an GSK3 ist außerdem, dass sie - im Gegensatz zu anderen an Zellzyklen beteiligten Enzymen - durch Phosphorylierung inaktiviert wird. Die zwei Isoformen werden hierbei jeweils an einem Serin phosphoryliert.<sup>65</sup>

Bisher sind vier Mechanismen zur Regulation der GSK3 beschrieben.<sup>64,67</sup> Der am besten bekannte und wohl auch der wichtigste Mechanismus ist hierbei die

Inaktivierung durch Phosphorylierung an Serin-9 (GSK3- $\beta$ ) bzw. an Serin-21 (GSK3- $\alpha$ ). Dies geschieht hauptsächlich durch aktiviertes Akt. Aber auch andere Enzyme, wie Proteinkinase A oder Proteinkinase C, scheinen in der Lage zu sein, GSK3 an den regulatorischen Serinen zu phosphorylieren.<sup>68</sup> Im Gegensatz dazu gibt es auch Hinweise, dass die GSK3-Aktivität durch Phosphorylierung an Tyrosin-216 (GSK3- $\beta$ ) und an Tyrosin-279 (GSK3- $\alpha$ ) erhöht wird. Die Mechanismen hierzu sind aber noch wenig definiert.<sup>67</sup> Einen weiteren Regulationsmechanismus der GSK3- $\beta$  stellt die intrazelluläre Lokalisation dar. Besonders aktiv ist die GSK3- $\beta$  im Zellkern oder in Mitochondrien.<sup>69</sup> Auch durch die Position innerhalb von Proteinkomplexen lässt sich die Aktivität der GSK3 substratspezifisch regulieren.<sup>67</sup> Ein weiterer Mechanismus, der Einfluss nimmt auf die GSK3-Aktivität, ist der Phosphorylierungsstatus ihrer Substrate.<sup>67</sup>



**Abbildung 1.4: Struktur der GSK3- $\beta$ .** Am N-Terminus findet sich vorwiegend  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (blau) zwischen den Aminosäuren 25 bis 138. Die  $\alpha$ -Helix-Domäne (magentarot) befindet sich zwischen den Aminosäuren 139 bis 349. Die ATP-Bindungsstelle ist zwischen  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix-Domäne lokalisiert und wird durch die Glycin-reiche Schleife begrenzt.<sup>70</sup> [adaptiert nach 70]

70

### 1.5.2 Einfluss der GSK3- $\beta$ auf verschiedene Erkrankungen

Die GSK3- $\beta$  ist an zahlreichen Erkrankungen beteiligt. Sie spielt hierbei sowohl in der primären Pathogenese als auch für das Fortschreiten vieler Erkrankungen eine entscheidende Rolle. So ist die GSK3- $\beta$  assoziiert mit endokrinen Erkrankungen wie Insulin-Resistenz und Diabetes<sup>71,72</sup>, sowie mit mehreren neurologischen Erkrankungen. Hierzu gehören neuroinflammatorische Erkrankungen, wie Multiple Sklerose<sup>73</sup>, neurodegenerative Störungen wie Morbus

Alzheimer<sup>74,75</sup> und zudem psychiatrische Krankheiten, wie die bipolare Störung<sup>76</sup>. Ferner scheint die GSK3 nach neurologisch-traumatischen Schädigungen, wie Rückenmarkstraumen, von Bedeutung zu sein.<sup>77</sup> Außerdem scheint GSK3- $\beta$  auf die Karzinogenese Einfluss zu haben, da sie an zwei Signalwegen, dem PI3K/Akt- und dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg maßgeblich beteiligt ist, die häufig bei Krebserkrankungen dysreguliert sind.<sup>67</sup> GSK3 könnte darüber hinaus ein möglicher Tumorsuppressor zu sein.<sup>67,78</sup> Bei Collagen-induzierter Arthritis wurden nach Behandlung mit einem GSK3- $\beta$ -Inhibitor eine 80%ige Reduktion der Gelenksschwellung und geringere histologische Schäden beobachtet.<sup>79</sup> Ähnliche Effekte hinsichtlich der inflammatorischen Prozesse erhielt man nach GSK3-Blockade im Tierexperiment für induzierte Peritonitis<sup>80</sup>, experimentelle Colitis<sup>81</sup> und für die Entzündung nach Verletzung bestimmter Organe, wie Herz<sup>82</sup>, Niere<sup>83</sup> oder Bronchien<sup>84</sup>.

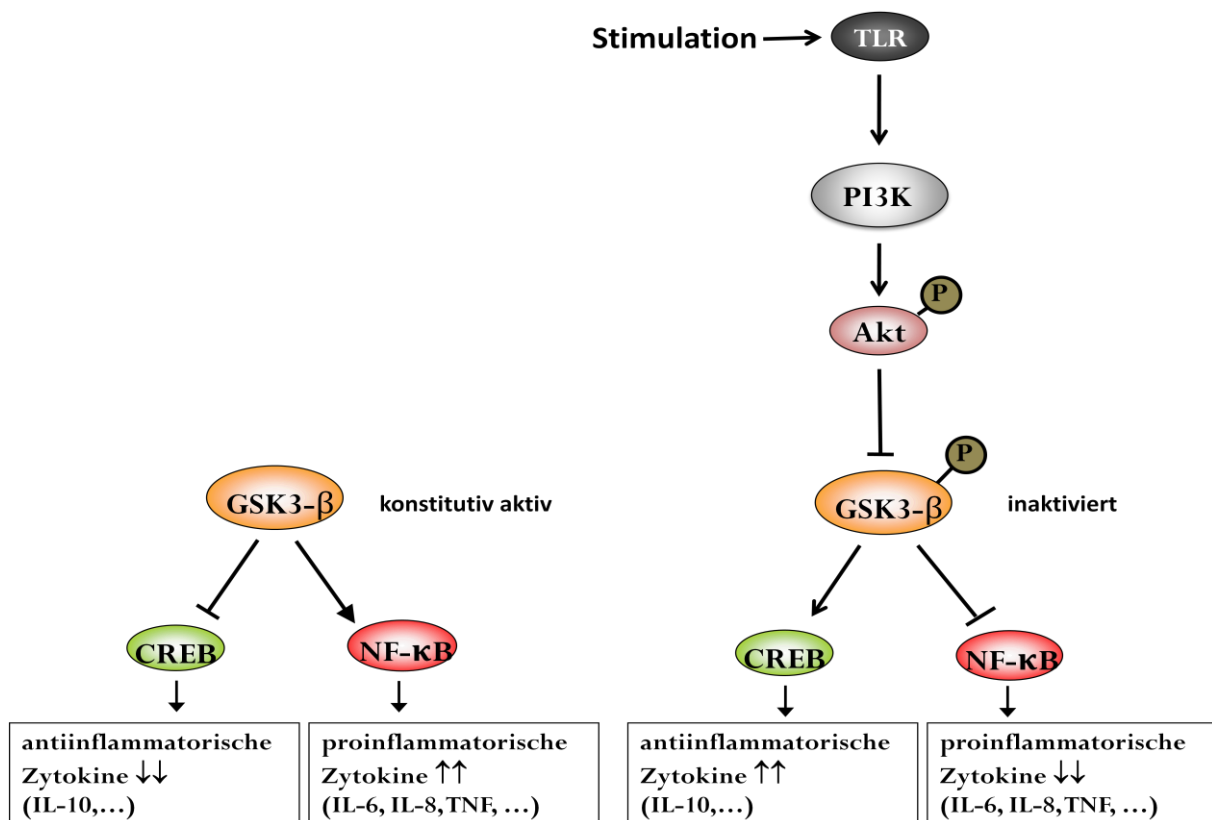
Eine Inhibition der GSK3- $\beta$  kann Mäuse vor einem Endotoxin-Schock und dadurch vor tödlicher Sepsis schützen. So zeigten Mäuse, die zuvor mit einer siRNA spezifisch für GSK3- $\beta$  behandelt wurden, nach Gabe einer 100% letalen Dosis (LD100) an LPS ein Überleben von über 70%. In der Vergleichsgruppe ohne GSK3- $\beta$ -Hemmung überlebten keine Mäuse (0%).<sup>85</sup>

### 1.5.3 GSK3- $\beta$ -abhängige Signalwege

Wie bereits beschrieben ist die GSK3- $\beta$  an mehreren Signalwegen beteiligt. Sie nimmt Einfluss auf zahlreiche zelluläre Vorgänge, wie die Zellfunktion, Zellstruktur und Genexpression.<sup>67</sup> Auch Apoptose<sup>86</sup>, Zellmobilität und Entzündungsreaktionen werden über GSK3- $\beta$  reguliert.<sup>67</sup> Die wohl wichtigsten und am besten erforschten Signalwege sind hierbei der PI3K/Akt- und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.

Durch den PI3K/Akt-Signalweg und die damit verbundene GSK3- $\beta$ -Inaktivierung ist es möglich, den Körper bzw. das umliegende Gewebe vor einer übermäßigen Entzündungs- und Immunreaktion zu schützen. Über Toll-like-Rezeptor (TLR) – Stimulation durch bestimmte bakterielle Antigene kommt es zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), einem heterodimeren Enzym, das aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen Untereinheit (p110) besteht.<sup>87,88,89</sup> Die aktivierte PI3K katalysiert über die p110-Untereinheit die Phosphorylierung von Akt. Akt wird hierbei ebenfalls durch Phosphorylierung an Threonin-308 und Serin-473

aktiviert.<sup>90,91</sup> Aktiviertes Akt phosphoryliert anschließend GSK3- $\beta$  an Serin-9 wodurch GSK3- $\beta$  inaktiviert wird.<sup>92</sup> GSK3- $\beta$  beeinflusst mehrere Transkriptionsfaktoren und kann somit die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen steuern. Nach GSK3- $\beta$ -Blockade wird die Immunreaktion über CREB-Aktivierung und NF- $\kappa$ B-Hemmung in Richtung der antiinflammatorischen Zytokine, wie IL-10, verschoben.<sup>85,93</sup> Die konstitutiv aktive Form der GSK3- $\beta$  fördert hingegen die NF $\kappa$ B-Aktivität und somit die Sekretion proinflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-12 oder TNF.<sup>85</sup> (Abbildung 1.5) Aufgrund der bisherigen experimentellen Datenlage, bleibt nicht ausgeschlossen, dass noch weitere Moleküle durch GSK3 moduliert werden.



**Abbildung 1.5: Regulation der Produktion pro- bzw. antiinflammatorischer Zytokine über die Aktivität von GSK3- $\beta$ .** Die konstitutiv aktive Form der GSK3- $\beta$  fördert durch NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Eine Hemmung der GSK3- $\beta$ -Aktivität nach TLR-Stimulation über den PI3K/Akt-Signalweg führt über eine verstärkte CREB-Aktivität zur Verschiebung des Gleichgewichts der Zytokinsekretion in Richtung der antiinflammatorischen Zytokine.

Einen weiteren Signalweg, an dem die GSK3- $\beta$  maßgeblich beteiligt ist, stellt der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg dar. Ohne Wnt-Aktivierung liegt GSK3- $\beta$  in der aktiven Form vor und ist somit in der Lage  $\beta$ -Catenin zu phosphorylieren. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird anschließend ubiquitiniert und im 26S-Proteasom abgebaut. Durch diesen Mechanismus wird der  $\beta$ -Catenin-Spiegel in der Zelle niedrig gehalten.<sup>94</sup> Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt hingegen zur Inaktivierung von GSK3- $\beta$  durch Phosphorylierung und anschließend zur  $\beta$ -Catenin-Akkumulation.<sup>94,95</sup>  $\beta$ -Catenin wird nun vermehrt aus dem Zytoplasma in den Zellkern transloziert, wo es mit dem Transkriptionsfaktor TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) assoziiert und die Transkription verschiedener Gene beeinflussen kann, die u.a. Vorgänge wie die Zellproliferation regulieren.<sup>95,96</sup>

Die GSK3- $\beta$ -Aktivität kann außerdem über klassische MAPK-Signalwege (*mitogen activated protein kinase*) reguliert werden. Viele „Downstream“-Kinasen der MAPK-Kaskade sind in der Lage, GSK3- $\beta$  an Ser9 zu phosphorylieren.<sup>97</sup> Wichtige MAP-Kinasen sind hierbei ERKs (extracellular signal-related kinases) und p38. ERKs werden hauptsächlich durch Mitogene stimuliert, wohingegen p38 vor allem durch Zytokine und nach zellulärem Stress aktiviert wird. Die Aktivierung von ERKs und p38 erfolgt über Phosphorylierung.<sup>98</sup>

#### 1.5.4 Experimentelle Inhibition der GSK3- $\beta$

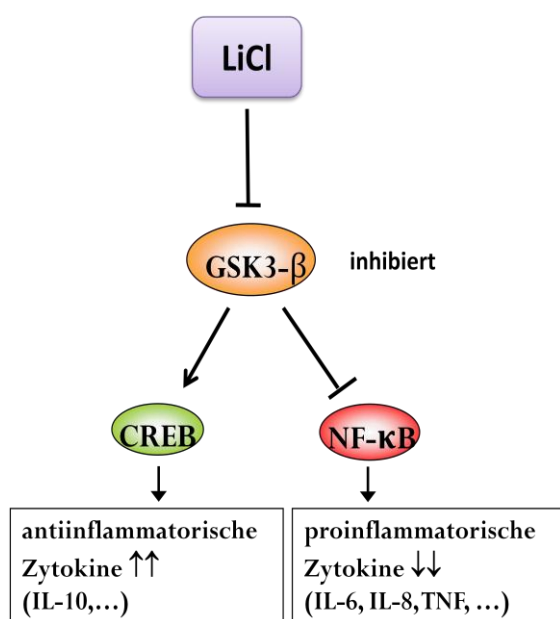
Um die Funktion der GSK3- $\beta$  zu erforschen, ist es nötig, mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren Einfluss auf die Aktivität dieses Enzyms zu nehmen. Dafür stehen mehrere, sehr unterschiedliche Substanzen zur Verfügung. Zu den spezifischen GSK3-Inhibitoren zählen LiCl<sup>99</sup>, Azakenpaullone<sup>100</sup> (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>BrN<sub>3</sub>O), BIO<sup>101</sup> (6-Bromoindirubin-3'-oxim), SB-216763 und SB-415286 (zwei niedermolekulare Inhibitoren)<sup>102</sup>.

Für diese Arbeit wurde LiCl als GSK3-Inhibitor verwendet. Der Vorteil von LiCl ist, dass es in der Handhabung einfach ist und sich in den meisten Medien gut lösen lässt. Lithium ist in der Medizin vor allem als wirksames Medikament bei bipolarer Störung (früher als manische Depression bezeichnet) bekannt und wird hierzu schon seit über 50 Jahren erfolgreich eingesetzt. Der Wirkmechanismus war dabei lange

Zeit unklar. Aufgrund der neuesten Daten spricht vieles dafür, dass der therapeutische Effekt des Lithiums hierbei auf einer GSK3-Hemmung beruht.<sup>67,103</sup>

Lithium hemmt die GSK3 durch zweierlei Mechanismen, zum einen als direkter, reversibler, kompetitiver Inhibitor zu  $Mg^{2+}$ , einem Co-Faktor der GSK3, und zum anderen indirekt, indem es eine Phosphatase hemmt, die phosphoryliertes, inaktives GSK3- $\beta$  dephosphoryliert und somit in die aktive Form umwandeln kann.<sup>104</sup> Lithium erhöht somit also auch die phosphorylierte Form der GSK3- $\beta$ .<sup>105</sup>

Durch Hemmung der GSK3- $\beta$  wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B vermindert, wohingegen die Produktion antiinflammatorischer Zytokine über CREB-Aktivierung gesteigert wird. (Abbildung 1.6) Eine Schnittstelle und Erklärung für die differenzierte Aktivierung und gegenseitige Hemmung von NF- $\kappa$ B und CREB ist die Konkurrenz um die Bindung an den Co-Faktor CBP (CREB-bindendes Protein). Die Menge an vorhandenem CBP ist beschränkt. In ihrer phosphorylierten Form konkurrieren CREB und NF- $\kappa$ B um eine Bindung an CBP.<sup>106,107,108</sup> Eine erhöhte Bindungsrate von CREB an CBP erniedrigt folglich die Aktivität von NF- $\kappa$ B. GSK3 in ihrer aktiven Form vermindert die Aktivität und DNA-Bindefähigkeit von CREB.<sup>109</sup> Bei GSK3-Inhibition durch LiCl führt jedoch eine erhöhte Assoziation von CREB mit CPP zu einer vermehrten Sekretion antiinflammatorischer Zytokine.<sup>85</sup>



**Abbildung 1.6: Hemmung von GSK3- $\beta$  durch LiCl.** Durch Blockade der GSK3- $\beta$  wird die Zytokinproduktion über CREB-Aktivierung in Richtung der antiinflammatorischen Zytokine verlagert. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine wird aufgrund der NF $\kappa$ B-Hemmung vermindert.



## 2 Arbeitsziele

Die Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen stellt in der heutigen Medizin eine große Herausforderung dar. Trotz immer neuer Therapiestrategien ist eine Heilung bisher noch nicht möglich. Die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist ebenfalls nicht hinreichend geklärt. Eine fehlregulierte TLR-Signaltransduktion scheint entscheidend für die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung zu sein. Welche Signalmoleküle des TLR-Signalwegs unter chronisch entzündeten Bedingungen verändert aktiviert sind, ist bisher jedoch nicht bekannt. GSK3- $\beta$  wurde kürzlich als Regulator der TLR-abhängigen Signaltransduktion beschrieben.<sup>85</sup> Die Aktivität des Enzyms fördert pro-inflammatorische Immunantworten in Blutmonozyten, während anti-inflammatorische Mechanismen blockiert werden.<sup>85</sup> Die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass die Hemmung von GSK3- $\beta$  mittels LiCl auch überschießende TLR-vermittelte Immunantworten intestinaler Immunzellen auf bakterielle Bestandteile hemmt.<sup>93</sup> Die Rolle von GSK3- $\beta$  bei Entzündungsprozessen in mesenchymalen Zellen ist jedoch bisher noch völlig unklar.

In dieser Arbeit sollten nun folgende Fragen untersucht werden:

1. *Gibt es grundlegende Unterschiede im (Aktivierungs-) Status von GSK3- $\beta$  in humanem Kolongewebe sowie in bestimmten humanen intestinalen Zellpopulationen? Besteht hierbei ein Unterschied zwischen Zellen von Kontroll und CED-Patienten?*

GSK3- $\beta$  fördert in ihrer aktiven (unphosphorylierten) Form in TLR-stimulierte Monozyten die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12, TNF und IFN- $\gamma$ , während die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 unterdrückt wird.<sup>85</sup> Der GSK3- $\beta$  Phosphorylierungsstatus könnte somit ein Maß für den proinflammatorischen bzw. anti-inflammatorischen Phänotyp einer Zelle sein.

In Gesamtgewebe sowie in bestimmten Zellpopulationen des menschlichen Darms soll daher der Protein- und Phosphorylierungsstatus von GSK3- $\beta$  mittels Western Blot untersucht werden. Hierbei sollen Proben von Kontroll-Patienten, MC- und CU-Patienten verglichen werden.

*2. Inwiefern wird die Immunantwort von Kolonepithelzellen durch Hemmung der GSK3- $\beta$  beeinflusst?*

Kolonepithelzellen stehen in direktem Kontakt zu Bestandteilen des Nahrungsbreis und der intestinalen Darmflora.

In Zellkulturmodellen mit der HT-29-Zelllinie sollen Stimulationsexperimente mit TNF und mit dem TLR-Ligand LPS je in An- und Abwesenheit des GSK3- $\beta$ -Inhibitors LiCl durchgeführt werden. Als Maß für die Entzündungsreaktion sollen Zytokine im Zellüberstand mittels ELISA sowie der GSK3- $\beta$ -Status und bestimmte Signalproteine mittels Western Blot bestimmt werden.

*3. In welcher Weise wird der Status von GSK3- $\beta$  und die Entzündungsreaktion primärer humaner CLPF durch den Kontakt mit Liganden verschiedener TLRs beeinflusst?*

Anhand von Stimulationsexperimenten soll der GSK3- $\beta$ -Status sowie die pro-inflammatorische Immunreaktion von primären humanen CLPF aus Kontroll-Patienten nach Kontakt mit Liganden unterschiedlicher TLRs untersucht werden.

*4. Welchen Einfluss nimmt die GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die Immunantwort von primären humanen CLPF? Kann eine Inhibition der GSK3- $\beta$  vor einer überschießenden Entzündungsreaktion schützen?*

CLPF sind potente Produzenten pro-inflammatorischer Mediatoren, die den Entzündungsprozess entscheidend beeinflussen können.<sup>8</sup> Durch *in vitro* Stimulationsexperimente mit primären humanen CLPF von Kontroll-, MC- und CU-Patienten soll untersucht werden, ob eine durch LPS (einem TLR-Liganden) oder durch TNF (einem endogenem Zytokin) induzierte Immunantwort durch GSK3- $\beta$ -Inhibition (mittels LiCl) moduliert werden kann und inwiefern bestimmte intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse durch Hemmung von GSK3- $\beta$  beeinflusst werden. Falls sich hierbei signifikante Unterschiede zeigen, soll die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB anhand von DNA-Bindungsassays mit Zellkernextrakten von *in vitro* stimulierten CLPF bestimmt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Kultur und Stimulation primärer Fibroblasten

Amino Acids (100x) Non Essential, 100 ml	PAA Laboratories GmbH Pasching Österreich
Amphotericin B, 50 mg	Bristol-Myers-Squibb, München
Ciprobay® 200, 100 ml Wirkstoff: Ciprofloxacin	Bayer AG, Leverkusen
CpG	Metabion, Martinsried
DMEM High Glucose (4,5 g/l), 500 ml with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH Pasching Österreich
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's PBS (1x), 500 ml without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH Pasching Österreich
Flagellin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Gentamicin	Biochrom, Berlin
LiCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
LPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pam2CSK4	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Penicillin/Streptomycin (100x), 100 ml Penicillin: 10.000 Units/ml Streptomycin: 10 mg/ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Quantum 333 for Fibroblasts, 500 ml with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Sodium Pyruvate Solution 100 mM, 100 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
TNF	Tebu Bio, Offenbach
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin ohne EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich

### 3.1.2 Kultur und Stimulation der Epithelzelllinie HT-29

Amino Acids (100x) Non Essential, 100 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 1000 mg glucose/l, L-glutamine, NaHCO <sub>3</sub> and pyridoxine HCl	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's PBS (1x), 500 ml without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
HT-29 Epithelzelllinie	ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, VA, USA
LiCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
LPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Quantum 286 for Epithelial Cells, 500 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Sodium Pyruvate Solution 100 mM, 100 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
TNF	Tebu Bio, Offenbach
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin ohne EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich

### 3.1.3 Chemikalien

β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Desoxycholsäure	Boehringer, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Glycerin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
HEPES	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Münche
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriummolybdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumorthovanadat ( $\text{NaVO}_3$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nonidet P-40 (NP-40)	Boehringer, Mannheim
Para-Nitrophenylphosphat (PNPP)	Fulka, Buchs
Proteaseinhibitor: Complete Mini	Boehringer, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS 10% und 20%	Fulka, Buchs
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 3.1.4 Verbrauchsmaterial

6-Well Zellkulturplatten	Corning Incorporated, NY, USA
12-Well Zellkulturplatten	Corning Incorporated, NY, USA
96-Well Zellkulturplatten	Corning Incorporated, NY, USA
96-Well-Mikrotiterplatten: Nunc® MaxiSorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
Cell-Scraper: costar®, 25 cm handle, 1,8 cm blade	Corning Incorporated, NY, USA
Combitips für Multipette®plus (5 ml; 10ml)	Eppendorf, Hamburg
Einmal-Pipetten, steril (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Corning Incorporated, NY, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (15 ml; 50 ml) BD Falcon™ Conical Tubes	BD, Franklin Lakes, NJ USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0)	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Corning Incorporated, NY, USA
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Corning Incorporated, NY, USA
Zellkulturschale: 100 mm x 20 mm	Corning Incorporated, NY, USA

### 3.1.5 ELISA

FCS	PAN Biotech, Aidenbach
IL-6 ELISA-Kit: BD OptEIA™ Set Human IL-6	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
IL-8 ELISA-Kit: BD OptEIA™ Set Human IL-8	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
IL-10 ELISA-Kit: BD OptEIA™ Set Human IL-10	BD Biosciences, San Diego, CA, USA
TMB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 3.1.6 Proteinbestimmung von Zelllysaten

Bicinchoninic Acid solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BSA	Biomol GmbH, Hamburg
Copper (II) sulfate solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 3.1.7 Western Blot

Antioxidant: NuPAGE® Antioxydant	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
BSA	Biomol GmbH, Hamburg
Fertiggel: NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 well	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
Laufpuffer: NuPAGE® MOPS SDS Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA Running
Nitrozellulosemembran: 0,45 µm Porengröße	Invitrogen, Carlsbad, CA USA
Röntgenfilm: Amersham Hyperfilm ECL (18 x 24 cm)	GE Healthcare, Freiburg
Standard: Amersham Full-Range Rainbow	GE Healthcare, Freiburg
Stripplösung: Re-Blot Plus Strong Solution (10x)	Millipore, Schwalbach
Substrat: Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Freiburg

Transferpuffer:

NuPAGE® Transfer Buffer (20x)

Invitrogen, Carlsbad, CA USA

Trockenmilchpulver

Roth, Karlsruhe

Tween 20

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 3.1.8 Antikörper

#### 3.1.8.1 primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Molekular- gewicht</u>	<u>Firma</u>
GSK-3β	Rabbit IgG	46 kDa	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
NFκB	Rabbit IgG	65 kDa	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
Phospho-Akt	Rabbit IgG	60 kDa	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
Phospho-CREB	Rabbit IgG	43 kDa	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
Phospho-p44/42	Rabbit IgG	42, 44 kDa	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
Phospho-GSK-3β	Rabbit IgG	46 kDa	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
Phospho-p38	Rabbit IgG	43 kDa	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
Phospho-Stat3	Rabbit IgG	79, 86 kDa	Cell Signaling Technology, Danvers MA, USA
Actin	Mouse IgG	43 kDa	Millipore, Schwalbach

**Tabelle 3.1: Primäre Antikörper.**

#### 3.1.8.2 sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Firma</u>
Mouse-IgG-HRP	Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rabbit-IgG-HRP	Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

**Tabelle 3.2: Sekundäre Antikörper.**

### 3.1.9 Proteinbestimmung von Zellkernlysaten

BSA

Biomol GmbH, Hamburg

Dye Reagent Concentrate  
BIO-RAD PROTEIN ASSAY

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

### 3.1.10 DNA-Bindungsassays

Aktivitätsassay TransAM™ pCREB	Active Motif, Carlsbad, USA
Aktivitätsassay TransAM™ NFκB	Active Motif, Carlsbad, USA

### 3.1.11 Geräte

Brutschrank: Heraeus Instruments BB6220	Heraeus Instruments, Hanau
Eismaschine: Scotsman AF 20	Scotsman, Mailand, Italien
Elektrophorese- und Western-Blot-Gerät: Invitrogen PowerEase 500	Invitrogen, Darmstadt
Elektrophorese- und Western-Blot-Kammer: Invitrogen Novex Mini-Cell XCell Sure Lock	Invitrogen, Darmstadt
ELISA-Reader/Photometer: Molecular Devices precision microplate reader	MWG-Biotech, Ebersberg
Entwicklermaschine: CURIX 60	AGFA, Düsseldorf
Filmkassette	Olympus, Stuttgart
Laborautoklav	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Laborschüttler: IKA® KS 260 basic	IKA® Werke, Staufen
Laborwaage: Sartorius MC 1 Laboratory LG 6200 S	Sartorius AG, Göttingen
Magnet-Rührer: Heidolph, MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskop: Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer Improved	Blaubrand, Wertheim
pH-Meter: Schott CG 840	Schott AG, Mainz
Pipettierhilfe: Multipette®plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe: Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences, Fernwald



---

**Reinstwasseraufbereitungsanlage:**

Millipore Q-POD® Milli-Q

Millipore, Schwalbach

**Sterilbank:**

Heraeus Instruments

Heraeus Instruments, Hanau

Lamin Air® HB 2448

**Thermomixer:**

Thermomixer comfort

Eppendorf, Hamburg

**Vortex:**

Heidolph Reax 2000

Heidolph, Schwabach

**Wasserbad:**

Ecoline Staredition

LAUDA, Lauda-Königshofen

**Zentrifugen:**

Heraeus Multifuge 3 S-R

Heraeus Instruments, Hanau

Heraeus Biofuge fresco

Heraeus Instruments, Hanau

### 3.1.12 Nachweis und Eigenschaften der verwendeten primären Zellen

#### 3.1.12.1 Gesamtbopsielsate

	Geschlecht	Patienten- alter	Diagnose	Medikamente
<b>Kontrollen</b>	männlich	76	Colon-Carcinom	unbekannt
	männlich	77	Sigma-/Colon-Carcinom	unbekannt
	weiblich	70	Sigmadivertikulose/-stenose	unbekannt
<b>Morbus Crohn</b>	männlich	18	Morbus Crohn	Budenofalk, Salofalk
	männlich	44	Morbus Crohn	Budesonid, Mesalazin
	männlich	47	Morbus Crohn	Prednisolon, Azathioprin
<b>Colitis Ulcerosa</b>	männlich	64	Colitis Ulcerosa	Hydrocortison
	weiblich	43	Colitis Ulcerosa	Decortin, Pentasa oral Pentasa rektal
	männlich	46	Colitis Ulcerosa	Azafalk, Salofalk

Tabelle 3.3: Gesamtbopsielsate.

#### 3.1.12.2 Kolonepithelzellen

		Geschlecht	Patienten- alter	Diagnose	Medikamente
<b>Kontrollen</b>	KO 1	männlich	74	Stenose linke Kolonflexur	unbekannt
	KO 2	männlich	86	Adenocarcinom des Kolon	unbekannt
	KO 3	weiblich	44	Ileozökalklappen-Carcinom	unbekannt
	KO 4	weiblich	61	Hemicolektomie rechts bei Verdacht auf Colon-Carcinom	unbekannt
<b>Morbus Crohn</b>	MC 1	weiblich	26	Morbus Crohn	Azathioprin
	MC 2	männlich	62	Morbus Crohn	keine
	MC 3	männlich	46	Morbus Crohn	keine
<b>Colitis Ulcerosa</b>	CU 1	weiblich	37	Colitis Ulcerosa	keine
	CU 2	männlich	34	Colitis Ulcerosa	Decortin, Targin
	CU 3	männlich	66	Colitis Ulcerosa	Prednisolon, Purinethol
	CU 4	männlich	52	Colitis Ulcerosa	Methylprednisolon, Mutaflor, Mesalazin

Tabelle 3.4: Kolonepithelzellen.

### 3.1.12.3 Colon Lamina Propria Fibroblasten

	Geschlecht	Patienten- alter	Diagnose	Lokalisation
<b>Kontrollen</b>	weiblich	25	unbekannt	Colon ascendens
	männlich	30	unbekannt	Sigma
	männlich	49	Sigmadivertikulitis	Sigma
	männlich	67	unbekannt	unbekannt
	weiblich	59	unbekannt	unbekannt
	männlich	65	Sigmadivertikulitis	Sigma
<b>Morbus Crohn</b>	weiblich	46	MC-Fistel	Rektovaginale Fistel
	weiblich	44	MC-Fistel	Rektovaginale Fistel
	weiblich	46	MC-Fistel	Perianale Fistel
	weiblich	36	Morbus Crohn	Coecum
	weiblich	36	Morbus Crohn	Sigma
	männlich	38	Morbus Crohn	Colon ascendens
	männlich	22	Morbus Crohn	Hemikolektomie links
<b>Colitis Ulcerosa</b>	männlich	25	Colitis Ulcerosa	Sigma
	weiblich	51	Colitis Ulcerosa	unbekannt
	männlich	60	Colitis Ulcerosa	Biopsie
	weiblich	46	Colitis Ulcerosa	Proktokolektomie
	weiblich	37	Colitis Ulcerosa	unbekannt

Tabelle 3.5: Colon Lamina Propria Fibroblasten.

### 3.1.12.4 Lamina Propria Mononukleäre Zellen

	Geschlecht	Patienten- alter	Diagnose	Medikamente
<b>Kontrollen</b>	männlich	86	Colon-Carzinom	unbekannt
	männlich	72	Tumor im Colon ascendens	unbekannt
<b>Morbus Crohn</b>	weiblich	24	Morbus Crohn (Stenose)	Steroide
	männlich	26	Morbus Crohn	unbekannt
<b>Colitis Ulcerosa</b>	weiblich	76	Colitis ulcerosa	Mesalazin, Tacrolimus
	weiblich	46	Colitis ulcerosa	Decortin H, Salofalk

Tabelle 3.6: Lamina Propria Mononukleäre Zellen.

### 3.1.13 Nährmedien und Puffer

#### 3.1.13.1 Nähr- und Stimulationsmedien

Nährmedium für primäre Fibroblasten:

500 ml	Quantum 333 for Fibroblasts
2 ml	Ciprofloxacin (Ciprobay 200)
500 µl	Gentamicin (50mg/ml)
500 µl	Amphotericin B (1mg/ml)
5 ml	Penicillin/Streptomycin

Stimulationsmedium für primäre Fibroblasten:

500 ml	DMEM High Glucose (4,5g/l)
2 ml	Ciprofloxacin (Ciprobay 200)
500 µl	Gentamicin (50mg/ml)
500 µl	Amphotericin B (1mg/ml)
5 ml	Penicillin/Streptomycin
5 ml	NEA (nicht-essentielle Aminosäuren) (100x)
5 ml	Sodium Pyruvate Solution 100 mM

Nährmedium für die HT-29 Zelllinie:

500 ml	Quantum 286 for Epithelial Cells (ohne Zusätze)
--------	--

Stimulationsmedium für die HT-29 Zelllinie:

500 ml	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1g Glukose/l)
5 ml	NEA (nicht-essentielle Aminosäuren) (100x)
5 ml	Sodium Pyruvate Solution 100 mM

#### 3.1.13.2 Allgemeine Puffer

PBS (10x):

80 g	NaCl
2,0 g	KCl
21,6 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
2,0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1 l	Aqua bidest.

pH 7,4

ELISA-Waschpuffer (Assay diluent):

500 ml	10x PBS unsteril
3, 5 l	Millipore-Wasser
2 ml	Triton X-100

Proteinisolierung:

## RIPA-Puffer (2X):

5 ml	Tris 1M
3 ml	NaCl 5M
1 g	Desoxycholsäure
1 ml	Triton X-100
500 µl	SDS 10%
ad 50 ml	Aqua bidest.

## RIPA-Lysepuffer:

5 ml	RIPA-Puffer (2x)
5 ml	NaCl 5M
1,5 ml	Proteaseinhibitor (1 Tablette Complete Mini in 1,5 ml Aqua bidest.)

Western Blot:

## Laemmli (6X):

2,5 ml	Tris 1,5M, pH 6,8
3 ml	SDS 20%
240 µl	EDTA 0,5M
2 ml	Glycerin
2,26 ml	Aqua bidest.
+	Bromphenolblau (ca. 1 Spatelspitze)

(pro 1,5 ml 6x Laemmli wurden vor Gebrauch 20 µl β-Mercaptoethanol zugegeben)

## Laemmli (2x):

2,5 ml	Tris 0,5M, pH 6,8
4 ml	SDS 10%
2 ml	Glycerin
1,5 ml	Aqua bidest.
+	Bromphenolblau (ca. 1 Spatelspitze)

(pro 1,5 ml 2x Laemmli wurden vor Gebrauch 20 µl β-Mercaptoethanol zugegeben)

## Running Puffer:

25 ml	MOPS SDS Running Buffer 20x
ad 500 ml	Aqua bidest.

## Transferpuffer:

25 ml	NuPAGE Transferbuffer (20x)
50 ml	Methanol
ad 500 ml	Aqua bidest.
+ 500 µl	NuPAGE Antioxidant

## TBST-Waschpuffer:

40 ml	Tris 1M, pH 7,5
60 ml	NaCl 5M
ad 2 l	Aqua bidest.
+ 2 ml	Tween 20

Herstellung von Zellkernextrakten:

## Phosphatase-Inhibitor Puffer (PIB):

125 mM	NaF
250 mM	$\beta$ -Glycerophosphat
250 mM	Para-Nitrophenylphosphat (PNPP)
25 mM	NaVO <sub>3</sub>

## PBS/PIB:

0,5 ml	PIB
10 ml	PBS

## Hypotonischer Puffer (HB):

20 mM	HEPES, pH=7,5
5 mM	NaF
10 $\mu$ M	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
0,1 mM	EDTA

(anschließend wurde der HB steril filtriert und bei 4 °C aufbewahrt)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Arbeiten mit primären humanen Colon Lamina Propria Fibroblasten

Für die Stimulationsexperimente wurden primäre humane Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) von Patienten mit Morbus Crohn, mit Colitis Ulcerosa und von Kontrollpatienten verwendet. Diese wurden aus chirurgischem Material oder Biopsien isoliert.

Alle Arbeiten mit primären humanen CLPF wurden unter der Sterilbank und mit steril verpackten Einmalpipetten bzw. mit autoklaviertem Material durchgeführt.

#### 3.2.1.1 Isolieren primärer humaner CLPF

Zur Isolierung der CLPF wurde die Mucosa in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und jeweils mindestens 6 solcher Stücke in 10 ml Hanks Solution mit 40 µl 0,5 M EDTA für 20 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dabei lösten sich die Epithelzellen ab und wurden mit dem Überstand verworfen. Zum weiteren enzymatischen Aufschluss wurde je drei Mucosa-Stücke in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem 700 µl PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, 250 µl Kollagenase I (4 mg/ml), 30 µl Desoxyribonuklease (10 mg/ml) und 20 µl Hyaluronidase (100 mg/ml) vorgelegt waren. Nach 30 Minuten Inkubation unter Schütteln wurde der Überstand verworfen und der Kollagenaseverdau durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt. Durch wiederholtes Zentrifugieren (Biofuge pico, 3500 rpm, 5 min bei Raumtemperatur) und Resuspension in neuem Medium wurden die Zellen gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in eine sterile 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und über Nacht bei 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei adhärten die Zellen am Boden der Kulturflasche. Nicht-adhärenente Zellen wurden beim Wechsel des Mediums entfernt.

#### 3.2.1.2 Kultur primärer humaner CLPF

Sobald die Zellen in der Kulturflasche konfluent gewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gespült und anschließend 2 ml Trypsin (0,5% in PBS) zugegeben. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, wurde die Trypsin-Wirkung durch Zugabe von Kultur-Medium gestoppt, die Zellsuspension

in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei Raumtemperatur und 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in neuem Kultur-Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturschale überführt.

Pro Schale und 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurden jeweils 10 ml Medium, pro 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche 5 ml Medium verwendet. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle drei Tage. Die Zellen wurden im Brutschrank bei einer Atmosphäre von 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

Sobald die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden sie nach obigem Schema mit Trypsin abgelöst und im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturschalen gesplittet.

#### **3.2.1.3 Einfrieren von primären humanen CLPF**

Zum Einfrieren der Fibroblasten wurde ein spezielles Einfriermedium, das im Gegensatz zum Kultur-Medium einen FCS-Gehalt von 20% und einen DMSO-Gehalt von 10% enthielt. Die konfluent gewachsenen CLPF wurden abtrypsiniert, zentrifugiert und in Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Konzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in spezielle Kryo-Reaktionsgefäße überführt. Die Röhrchen wurden bei -80 °C in einer speziellen Einfrierbox eingefroren, die eine Temperatursenkung von 1 °C pro Minute gewährleistet. Zur Langzeitlagerung konnten die Zellen in Flüssigstickstoff bei -196 °C aufbewahrt werden.

#### **3.2.1.4 Auftauen von primären humanen CLPF**

Zum Auftauen wurde das Röhrchen mit den eingefrorenen CLPF für 2 Minuten in ein Wasserbad bei 37 °C gestellt. Die Zellen wurden daraufhin in vorgewärmtem Kultur-Medium resuspendiert und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und dabei das bei Raumtemperatur als Zellgift wirkende DMSO entfernt. Die Fibroblasten wurden in neues Medium aufgenommen und in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt.



### 3.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl der CLPF wurde mittels einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt. Auf einer geschliffenen, leicht abgesenkten Glasplatte sind quadratische Zählnetze eingraviert. Durch dicht auf die seitlichen Glasstege aufgelegte spezielle Glas-Plättchen entsteht hier eine definierte Kammerhöhe von 0,1 mm. Die Eckquadrate des eingravierten Thomas-Netzes haben die exakte Fläche von 1 mm<sup>2</sup>. Somit enthält der Raum über einem Eckquadrat ein Volumen von 0,1 µl. Vor Auftragen auf die Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau angefärbt und somit um den Faktor zwei verdünnt. Es wurden nun die Zellen in vier Eckquadraten ausgezählt. Durch die Trypanblau-Färbung konnten die Zellen mit intakter Zellmembran von den beschädigten Zellen unterschieden werden. Intakte Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und bleiben hell. Zellen mit beschädigter Membran färben sich dunkelblau und werden bei der Zählung nicht berücksichtigt. Mit folgender Formel konnte nun die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times 2 \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

### 3.2.1.6 Stimulationsexperimente mit primären humanen CLPF

Für die Stimulationsexperimente wurden die CLPF in den Passagen 2 bis 7 verwendet.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen abtrypsiniert, zentrifugiert und das Pellet in 3 bis 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zell-Suspension wurde anschließend so verdünnt, dass sich 150.000 Zellen in 2 ml Medium befanden. In jedes well einer 6-well-Platte wurden nun 2 ml dieser Zellsuspension pipettiert. Pro well wurden also 150.000 Zellen ausgesät. Sobald die Zellen nach ca. 6 bis 8 Stunden am Boden der 6-well-Platte festgewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und pro well 2 ml DMEM-Stimulationsmedium zupipettiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Stimulation. Hierzu wurde erneut das Medium gewechselt. Bei allen Ansätzen, die mit LiCl kostimuliert werden sollten, wurde zunächst LiCl in der Konzentration 10 mM zugegeben und für 30 Minuten vorinkubiert. Daraufhin

wurden die Zellen mit LPS in der Konzentration 10 ng/ml bzw. TNF in der Konzentration von 1 ng/ml zupipettiert. Für eine spezielle Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden wurde mit Pam2Cys, LPS, Flagellin (je in einer Zielkonzentration von 10 ng/ml) und mit CPG (Zielkonzentration 2 µg/ml) stimuliert. Die Stimulation erfolgte für genau 24 Stunden. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und Zelllysate angefertigt.

Die Stimulation der Zellen, aus denen Zellkernextrakte für DNA-Bindungsassays angefertigt wurden, wurde wegen der benötigten hohen Zellzahl in Zellkulturschalen durchgeführt. Die Stimulanzen wurden in der entsprechend gleichen Konzentration verwendet.

### **3.2.2 Arbeiten mit der Epithelzelllinie HT-29**

Bei der HT-29-Zelllinie handelt es sich um eine adhärent wachsende, humane Kolonkarzinomzelllinie, die erstmals aus dem Primärtumor einer 44-jährigen Frau isoliert wurde.

Die Kultur der HT-29-Zellen erfolgte im Brutschrank in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflschen bei einer Atmosphäre von 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Alle Arbeiten mit den HT-29-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zum Schutz vor Mykoplasmen wurde die Sterilbank vor dem Arbeiten mit HT-29-Zellen für 20 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

Nach Erreichen der Konfluenz wurde zum Splitten das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gespült und anschließend 2 ml Trypsin (mit EDTA) zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Sekunden wurde das Trypsin abpipettiert. Die sich nun ablösenden Zellen wurden in 10 ml neues Medium aufgenommen. Das Splitten erfolgte im Verhältnis 1:10. Hierzu wurden 1 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und 9 ml Medium dazugegeben.

Die HT-29-Zellen wurden einmal pro Woche gesplittet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage.

Die Stimulation erfolgte unter denselben Bedingungen wie die Stimulation primärer humaner CLPF. Von den HT-29 –Zellen wurden für die Stimulationsexperimente je 1 Million Zellen pro well ausgesät.

### 3.2.3 Western Blot

Mithilfe des Western Blots gelingt es, Proteine eines Proteingemisches ihrer Größe nach aufzutrennen und anschließend zu identifizieren. Die Auftrennung nach Molekulargewicht erfolgt durch SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulphat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion gespalten und somit die Tertiärstruktur der Proteine gelöst. SDS lagert sich an die Proteine an, sodass diese eine regelmäßige negative Ladung erhalten. Somit unterscheiden sich die Proteine nur noch in ihrer Molekülgröße bzw. in ihrem Molekulargewicht. Dies hat zur Folge, dass die unterschiedlich langen Proteine nach Anlegen von Spannung unterschiedlich schnell durch die Lücken des dreidimensionalen Polyacrylamid-Netzes wandern. Die Beweglichkeit ist umso höher, je kleiner die Proteine und je größer die Maschen im Polyacrylamid-Gel sind. Anschließend werden die Proteine durch Anlegen von Spannung auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (eigentlicher Blot). Die Identifizierung der Proteine erfolgt anschließend mittels spezifischer Antikörper, die mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar detektiert werden können.

#### 3.2.3.1 Herstellung der Zelllysate

Nach Entfernung des Stimulations- bzw. Nährmediums wurden die Platten mit den am Boden adhärenen Zellen auf Eis gestellt. Als Puffer wurde je nach Größe der Platte 1 bis 2 ml vorgekühltes PBS zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin mit einem „cell scraper“ vom Boden abgeschabt. Anschließend wurden die abgeschabten Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und bei 4 °C und 5000 rpm fünf Minuten lang abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Die Pellets, die nun die Zellen enthielten, wurden je nach Pelletgröße in 30  $\mu$ l bis 100  $\mu$ l 1x RIPA resuspendiert und für 30 Minuten zur Lyse der Zellmembran auf Eis inkubiert. Das nun erhaltene zytosolische Lysat wurde für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand, in dem sich nun die zytosolischen Proteine befanden, wurde in ein neues vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert.

### 3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde mittels BCA-Protein-Assay photometrisch bestimmt. Diese Methode beruht auf der quantitativen Reaktion von zweiwertigen Kupferionen mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Diese bilden anschließend proportional zur Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex, der bei 562 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Die Zunahme der Absorption bei 562 nm ist ein Maß für den Proteingehalt der Zelllysate. Um den absoluten Wert der Proteinkonzentration zu ermitteln wurde eine BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration als Standard eingesetzt. Mittels der Eichkurve war es möglich die genaue Proteinkonzentration der Lysate anhand der Absorption zu berechnen.

Zur Proteinbestimmung wurden je 10 µl Probe eingesetzt. Es erfolgte die Zugabe von je 200 µl „working reagent“, bestehend aus Bicinchoninic Acid solution und Copper (II) sulfate solution im Verhältnis fünfzig zu eins. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

### 3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden Fertiggele der Firma Invitrogen mit geeigneter Porengröße verwendet.

Zur Vorbereitung der Proben wurden die Zelllysate entsprechend ihrer Proteinkonzentration zu äquivalenten Proteinmengen zwischen 5 und 30 µg in Reaktionsgefäße pipettiert und mit aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl bzw. 33,3 µl eingestellt. Anschließend wurde zu allen Proben 20 µl 2x Laemmli-Puffer (bei 20 µl Ansatz) bzw. 6,7 µl 6x Laemmli-Puffer (bei 33,3 µl Ansatz) zugegeben. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 95 °C wurden die Proben kurz abzentrifugiert und anschließend in die Taschen des Gels überführt. Die Gel-Kassette wurden bereits vorher in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt, sodass sich das Gel vollständig in Laufpuffer befand. Um die Identifizierung der Proteine zu erleichtern, wurde auf jedes Gel außerdem ein Standard mit Proteinen bekannter Konzentration aufgetragen. Nach Beladen der Gele wurde eine Spannung von 160 V angelegt. Die Laufdauer betrug ca. 1,5 h.

#### **3.2.3.4 Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran**

Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mit dem X-Cell II™ Mini-Cell Blot-Modul mittels Tank-Blot-Technik. Hierfür wurde eine Sandwich-Anordnung aus Schwämmen, Whatman-Filterpapieren, dem Polyacrylamid-Gel und der Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) hergestellt. Auf die Kathodenseite des Blot-Moduls wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt. Darauf folgte eine Anordnung aus je einer Lage Whatman-Filterpapier, Polyacrylamid-Gel, Nitrozellulosemembran, Whatman-Filterpapier und weiteren getränkten Schwämmen. Beim Aufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen befanden, da sonst nur ein unvollständiger Transfer stattgefunden hätte. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für die Dauer einer Stunde.

#### **3.2.3.5 Detektion der Proteine mittels Antikörper**

Um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen wurde die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur in Blockierlösung (5%-ige Milchlösung bzw. 5%-ige BSA-Lösung in Waschpuffer) inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurzzeitig mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation des mit Blockierlösung verdünnten primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C bzw. bei RT für mindestens eine Stunde unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde die Membran 60 min lange gewaschen, wobei jeweils nach 10 min der Waschpuffer ausgetauscht wurde. Nun wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten, gegen den primären Antikörper gerichteten sekundären Antikörper (ebenfalls in Blockierlösung verdünnt) für eine weitere Stunde inkubiert. Die Membran wurde erneut nach dem obigen Schema gewaschen und anschließend mit dem ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit entwickelt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde die Membran in eine Kassette zwischen zwei Folien eingelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Hyperfilm aufgelegt und nach angepasster Expositionsdauer (wenige Sekunden bis 15 Minuten) entwickelt.

### 3.2.3.6 Strippen der Membranen

Um die Membran für weitere Immundetektionen verwenden zu können, wurden im weiteren Verlauf die gebundenen Antikörper mittels „Stripping“ von der Membran entfernt. Hierfür wurde die Membran für 15 Minuten in einer 1:10 verdünnten Lösung Re-Blot-Plus Strong (10x) der Firma Millipore unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran für zweimal 5 Minuten gewaschen.

### 3.2.4 ELISA

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Stoffen mit bestimmten Antigenen, das auf Antigen-Antikörper-Reaktionen sowie einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Die Signalstärke der Farbreaktion ist eine logarithmische Funktion der Stoffmenge bzw. Konzentration des zu bestimmenden Stoffes, sodass mit dieser Methode ein quantitativer Nachweis sehr gut möglich ist. In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren ausschließlich zum Nachweis bestimmter Zytokine im Überstand der stimulierten Zellkulturen verwendet. Auf einer festen Phase (96-well Mikrotiterplatte) befinden sich fest gebundene („coating“) Antikörper, die gegen ein bestimmtes Antigen des zu bestimmenden Stoffes gerichtet sind. Um unspezifische Bindungen zu verhindern werden die „gecoateten“ Antikörper mit einer Blockierlösung (FCS) inkubiert. Nach kurzem Waschen wird eine Lösung mit unbekannter Konzentration des gesuchten Stoffes in die Wells einpipettiert und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Hierbei kommt es zur Antigen-Antikörper Reaktion. Anschließend werden durch mehrmaliges Waschen alle ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt. Die zu bestimmende Substanz bleibt am Antikörper gebunden. In einem nächsten Schritt wird ein weiterer, in Blockierlösung verdünnter, biotinylierter Antikörper zugegeben, der ebenfalls gegen den gesuchten Stoff gerichtet ist. Wichtig hierbei ist, dass dieser Antikörper gegen ein anderes Epitop des zu bestimmenden Stoffes gerichtet ist als der coating-Antikörper, da sich die Antikörper sonst in ihrer Wirkung behindern. Nach gründlichem Waschen wird ein Streptavidin-HRP-Konjugat zugegeben. Hierzu wird die starke spezifische Wechselwirkung zwischen Biotin am Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex und Streptavidin genutzt. Nach mehrfachen Waschen wird Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat für die Meerrettichperoxidase (HRP) zugegeben. Dabei entsteht ein blaues Endprodukt, welches nach Abstoppen mit Schwefelsäure einen gelben Farbkomplex bildet. Dieser Farbkomplex ist für ca. eine

halbe Stunde stabil und kann photometrisch bestimmt werden. Um eine Kalibrierungskurve erstellen zu können wird eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration mitgemessen.

Für diese Arbeit wurden ELISA-Kits der Firma BD Biosciences verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Protokolle des Herstellers.

Die Auswertungen wurden mit der Software *SOFTmax for Windows 2.35* durchgeführt.

### **3.2.5 DNA-Bindungs-Assay zum Nachweis von Transkriptionsfaktoren**

Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wurde nach Stimulation der CLPF mithilfe von DNA-Bindungs-Assays gemessen. Hierfür wurden Zellkernlysate angefertigt.

#### **3.2.5.1 Herstellung der Zellkernlysate**

Nach Abnahme der Überstände wurden die Platten mit den am Boden haftenden Zellen sofort auf Eis gestellt und pro well wurden 2 ml eiskaltes PBS zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mittels eines „cell-scrapers“ vom Boden der Schalen abgeschabt und in ein Falcon-Reaktionsgefäß transferiert. Um möglichst keine Zellen zu verlieren wurden die Schalen je zweimal mit 1 ml PBS gespült und die Suspension ebenfalls in die Falcon-Gefäße überführt. Nach Zentrifugieren bei 1800 rpm und 4 °C für 10 min wurden die Überstände verworfen. Die Zellen wurden daraufhin mit je 100 ml PIB/PBS gewaschen und wiederum bei 1800 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Zu den Zellpellets wurden je 500 µl eisgekühlter HB-Puffer zupipettiert. Die Zellen schwellen hierbei sichtbar an und die Suspension wird trüb. Nach einer Inkubationszeit von 4 bis 5 Minuten auf Eis wurden 12,5 µl Nonidet P-40 und der Ansatz 1 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet, das nun die Zellkerne enthält, wurde in 50 ml Complete Lysis Buffer des Aktivitätsassays resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 10000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, der die Zellkernextrakte enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

### **3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellkernextrakten**

Für die Proteinbestimmung wurden je 3 µl der Zellkernextrakte eingesetzt. Diese wurden mit je 797 µl PBS verdünnt. Um eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration zu ermöglichen wurde eine Standardreihe mit abgestuften Endkonzentrationen von 0 bis 20 µg/ml mitgemessen. Zu alle Ansätze wurden je 200 µl Dye Reagent Concentrate zupipettiert und mittels Vortex gut durchmischt. Je mehr Protein in den Proben enthalten ist umso blauer färbt sich die Lösung. Diese Reaktion beruht auf dem Bradford-Test. Das darin enthaltene Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen blaue Komplexe. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Proben auf eine 96 well-Platte übertragen und bei 650 nm photometrisch gemessen. Die erhaltenen Werte des ELISA-Readers müssen anschließend noch auf die Konzentration der ursprünglich eingesetzten 3 µl Probe umgerechnet werden.

### **3.2.5.3 Aktivitäts-Assay**

Zur Bestimmung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF-κB und CREB in den Zellkernextrakten der stimulierten Zellen wurden DNA-Bindungs-Assays der Firma Active Motif verwendet. Die Fertig-Kits enthalten 96-well-Platten, die mit Oligonukleotiden gecoatet sind, die spezifische Bindungsstellen für die aktivierten Transkriptionsfaktoren NF-κB bzw. CREB darstellen. Die Assays beruhen auf dem Prinzip der ELISA-Methode. Die Durchführung erfolgte streng nach den Anweisungen des Herstellers.

### **3.2.4 Statistik**

Alle Messwerte wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit relativ auf den Wert der unstimulierten Probe bezogen. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Ab einem p-Wert von < 0,05 wurden die Ergebnisse als signifikant angesehen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Proteinstatus und Grundaktivität der GSK3- $\beta$ in humanem Kolongewebe sowie in unstimulierten humanen intestinalen Zellpopulationen zeigen keine einheitliche Tendenz

Zu Beginn der Arbeit wurden bestimmte Zellpopulationen des menschlichen Darms, die maßgeblich an Immunreaktionen beteiligt sind, hinsichtlich des GSK3- $\beta$ -Status untersucht.

Die Proteinmenge sowie die Phosphorylierung der GSK3- $\beta$  wurden mittels Western Blot bestimmt. Da ein direkter Nachweis der aktiven Form der GSK3- $\beta$  nicht möglich ist, kann nur indirekt über die Bestimmung der inaktiven, phosphorylierten Form und der Gesamtmenge an GSK3- $\beta$  auf die Enzymaktivität geschlossen werden.

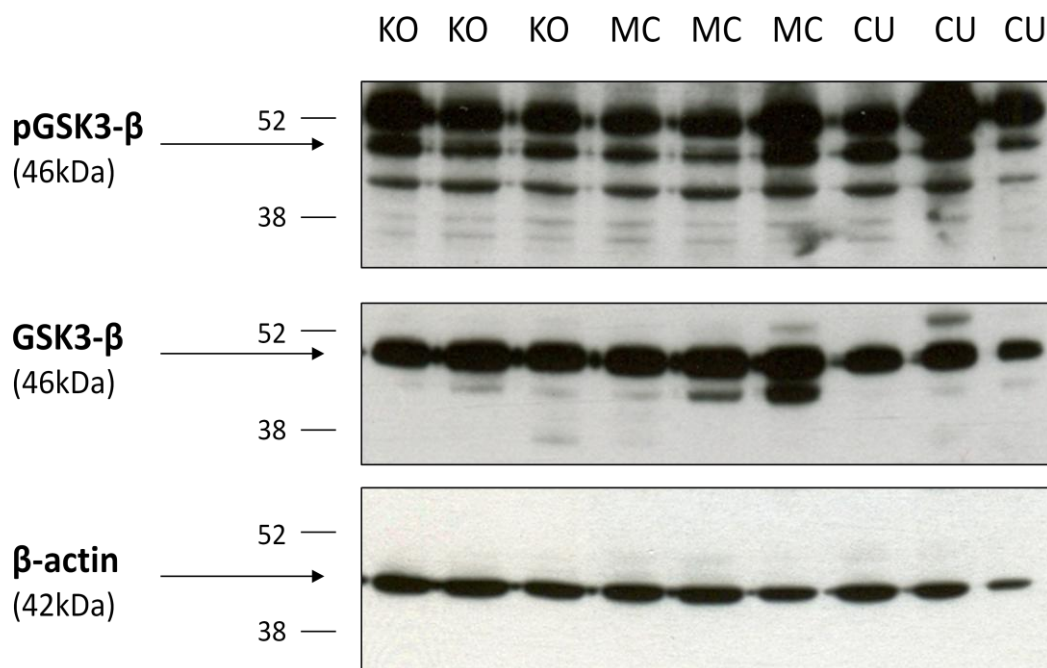
In diesen Versuchen wurden jeweils Proben aus Gesamtgewebe der Kolonmukosa sowie definierten Zellpopulationen des menschlichen Darms von Kontroll-Patienten (ohne CED) mit Proben von MC-Patienten und CU-Patienten verglichen.

#### 4.1.1 GSK3- $\beta$ in Gesamtblasielysaten

Gesamtblasielysate enthalten alle Zellpopulationen der Kolonmukosa. Anhand dieser Western Blots sollte geklärt werden, ob es generelle Unterschiede im Proteinstatus und der Phosphorylierung der GSK3- $\beta$  in humanem Kolongewebe gibt.

Sowohl bei Kontroll- als auch bei MC und CU-Lysaten zeigte sich ein heterogenes Muster der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung. Eine einheitliche Tendenz zu einer gesteigerten bzw. reduzierten Phosphorylierung war jedoch nicht zu beobachten. (Abbildung 4.1)

Für die Gesamt-GSK3- $\beta$  zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben.



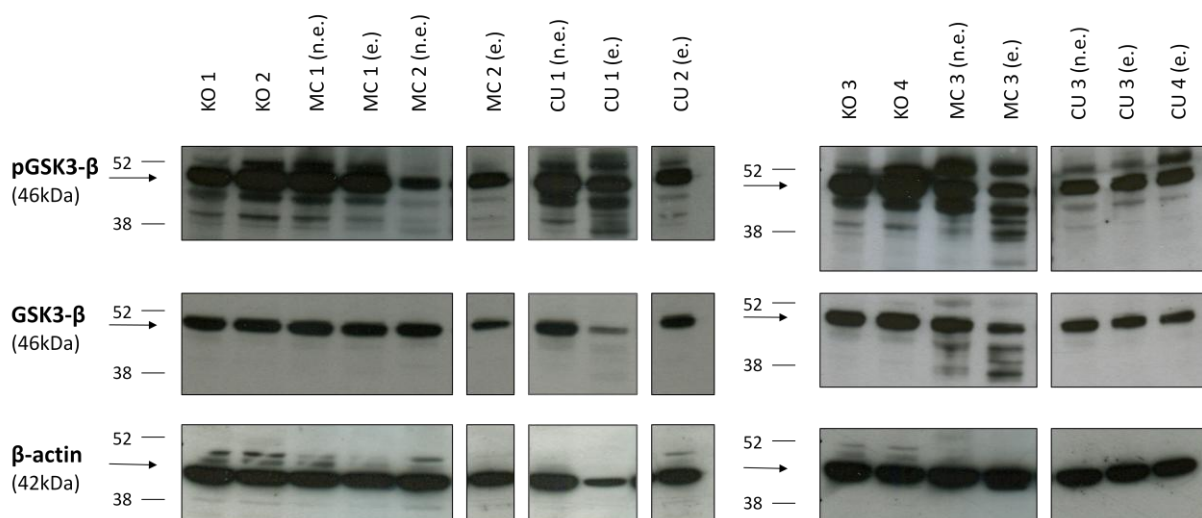
**Abbildung 4.1: Vergleich der Phosphorylierung von GSK3- $\beta$  in Gesamtblasielysaten von Kontroll- und CED-Patienten mittels Western Blot.** KO: Kontrolle, MC: Morbus Crohn, CU: Colitis Ulcerosa. 20  $\mu$ g Protein.

#### 4.1.2 Die basale GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in primären humanen Kolonepithelzellen ist tendenziell erniedrigt in CED-Gewebe

Humane Kolonepithelzellen kleiden den menschlichen Darm aus und besitzen aufgrund des engen Kontakts zu diversen Bestandteilen des Darminhalts wichtige immunregulatorische Funktionen. Deshalb sollte der Status der GSK3- $\beta$  in Kolonepithelzellen untersucht werden.

In Western Blots wurde der GSK3- $\beta$ -Status in primären humanen Kolonepithelzellen von Kontroll-Patienten mit MC- und CU-Patienten verglichen. Bei den CED-Patienten wurde zwischen Proben aus entzündetem (e.) und nicht-entzündetem (n.e.) Gewebe unterschieden.

Bei Kolonepithelzellen wurde ein heterogenes Muster der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung beobachtet. Kontrollen wiesen eine deutliche Phosphorylierung auf, ebenso wie Kolonepithelzellen aus entzündetem CED-Gewebe. Das pGSK3- $\beta$ -Signal war vorwiegend in nicht entzündeten CED-Kolonepithelzellen schwächer. In Kolonepithelzellen aus entzündetem Gewebe der Patienten CU1 und MC3 wurde hingegen im Vergleich zu nicht-entzündetem Gewebe eine reduzierte Phosphorylierung beobachtet (Abbildung 4.2). Die Gesamtmenge an GSK3- $\beta$  war in allen Proben konstant.



**Abbildung 4.2: Vergleich der Phosphorylierung von GSK3- $\beta$  in primären Kolonepithelzellen von Kontroll- und CED-Patienten mittels Western Blot.** KO: Kontrolle, MC: Morbus Crohn, CU: Colitis Ulcerosa. 20  $\mu$ g Protein.

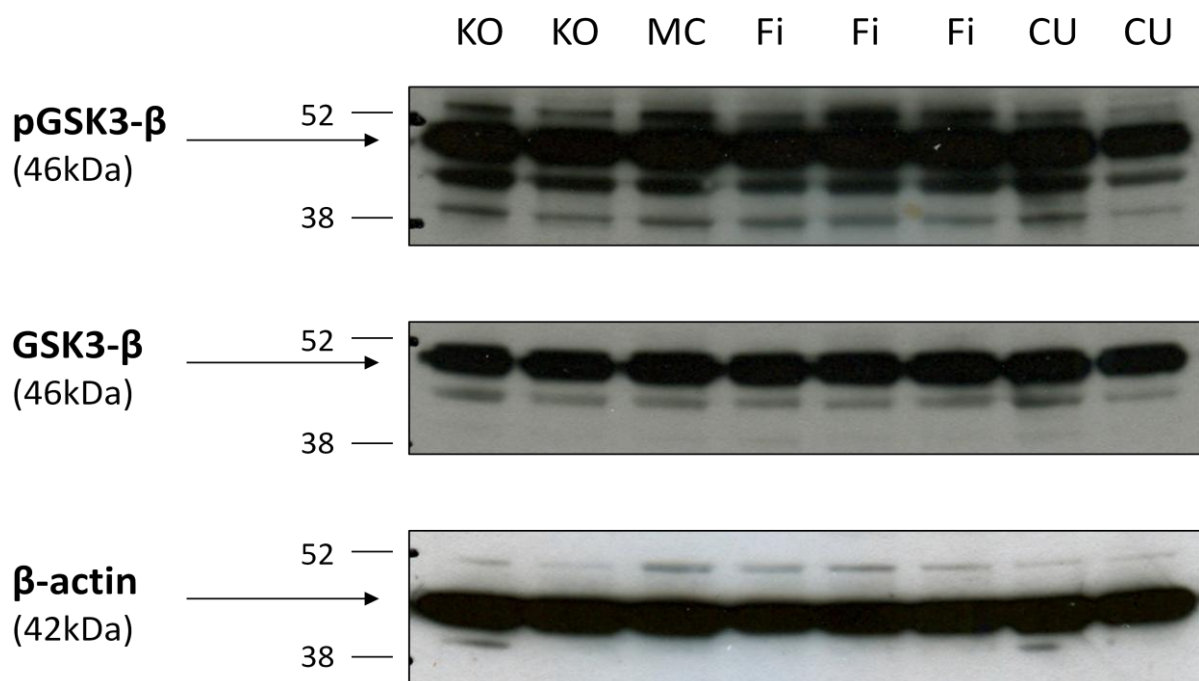
#### 4.1.3 Die GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in primären humanen Colon Lamina Propria Fibroblasten (CLPF) ist unabhängig von einer CED-Erkrankung

CLPF besitzen eine wichtige Funktion bei Entzündungsreaktionen und Reparaturvorgängen im menschlichen Darm.

In Western Blots wurde der Phosphorylierungs-Status von GSK3- $\beta$  in primären humanen CLPF von Kontroll- und CED-Patienten bestimmt. Zusätzlich wurden CLPF aus Fistel-Gewebe von MC-Patienten untersucht. Bei diesen Zellen handelt es sich um CLPF, die aus chirurgischem Material isoliert und in Zellkultur gehalten wurden.

Die CLPF zeigten ein sehr homogenes Verteilungsmuster der pGSK3- $\beta$ -Banden. CLPF aus Kontroll- und CED-Gewebe wiesen keine Unterschiede in der Phosphorylierung der GSK3- $\beta$  auf. Ebenso wurde keine Abweichung der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung von CLPF aus MC-Fistel-Gewebe gegenüber CLPF aus übrigem CED-Gewebe beobachtet. (Abbildung 4.3)

Die Signalstärke der Gesamt-GSK3- $\beta$  war in alle Proben sehr konstant.

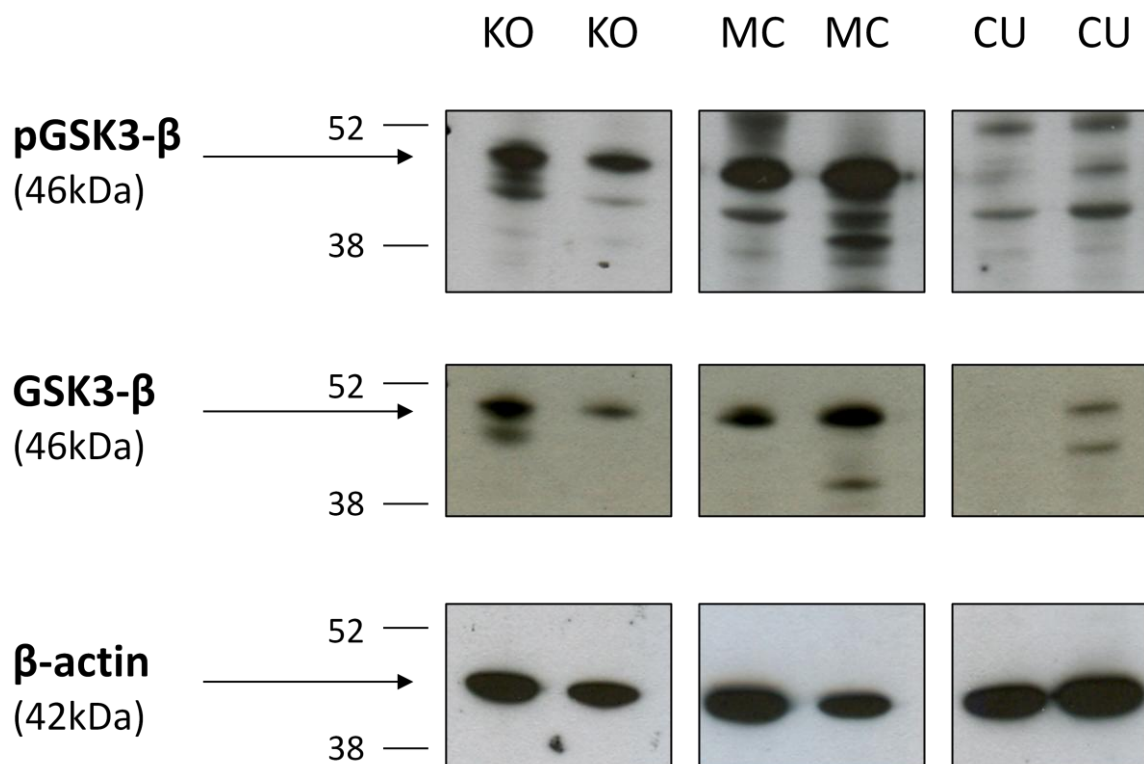


**Abbildung 4.3: Vergleich der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in unstimulierten primären humanen CLPF von Kontroll- und CED-Patienten mittels Western Blot.** KO: Kontrolle, MC: Morbus Crohn, Fi: Fistel bei Morbus Crohn, CU: Colitis Ulcerosa. 10  $\mu$ g Protein.

#### 4.1.4 Die GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in Lamina Propria Mononukleären Zellen ist abhängig von einer MC- und CU-Erkrankung

In Western Blots wurde die Phosphorylierung von GSK3- $\beta$  in primären LPMZ des menschlichen Darms von Kontroll- und CED-Patienten untersucht.

Die untersuchten LPMZ zeigten im Western Blot ein sehr heterogenes Verteilungsmuster der Banden sowohl für phosphorylierte als auch für Gesamt-GSK3- $\beta$ . Tendenziell entsprach die relative Bandenstärke der einzelnen Proben für pGSK3- $\beta$  in etwa ihrer Signalintensität von Gesamt-GSK3- $\beta$ . Im Vergleich zu Kontroll-LPMZ wiesen MC-LPMZ stärkere Signale an pGSK3- $\beta$  und Gesamt-GSK3- $\beta$  auf. Der Gehalt an pGSK3- $\beta$  und an Gesamt-GSK3- $\beta$  war bei CU-LPMZ sehr gering (bzw. nicht nachweisbar), was durch starke  $\beta$ -Actin-Signale bestätigt wird. (Abbildung 4.4)



**Abbildung 4.4: Vergleich der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in unstimulierten primären LPMZ von Kontroll- und CED-Patienten mittels Western Blot.** KO: Kontrolle, MC: Morbus Crohn, CU: Colitis Ulcerosa. 5  $\mu$ g Protein.

Die Bestimmung des Proteinstatus und der Phosphorylierung von GSK3- $\beta$  in primärem Kolon-Gewebe sowie in bestimmten primären Zellpopulationen des menschlichen Darms von Kontroll- und CED-Patienten ergab keine einheitliche Tendenz. Je nach Zellpopulation war die GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in unterschiedlicher Weise bei einer CED-Erkrankung verändert. Wohingegen bei den Kolonepithelzellen ein verändertes GSK3- $\beta$ -Phosphorylierungsmuster bei verschiedenen Entzündungsgraden beobachtet werden konnte, schien die Menge an phosphorylierter GSK3- $\beta$  bei LPMZ von der MC- oder CU-Erkrankung beeinflusst zu sein. CLPF wiesen hingegen einen sehr konstanten Gehalt an phosphorylierter GSK3- $\beta$  auf und zeigten keine Abweichung bei einer CED-Erkrankung.

#### **4.2 Modulation der Immunantwort der Epithelzelllinie HT-29 durch GSK3- $\beta$ Inhibition**

Da in den Western Blots mit unstimulierten primären humanen KEZ Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der GSK3- $\beta$  zwischen Kontroll- und CED-Kolonepithelzellen sowie zwischen entzündeten und nicht-entzündeten CED-Epithelzellen auffielen (siehe 4.1.2), wurde in weiteren Versuchen anhand der Epithelzelllinie HT-29 untersucht, inwiefern immunologische Reaktionen von Epithelzellen durch Blockierung von GSK3- $\beta$  beeinflusst werden.

HT-29-Zellen wurden für 24 Stunden mit TNF (1 ng/ml) oder LPS (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von LiCl (10 mM) - einem GSK3- $\beta$  Inhibitor - stimuliert. In den Zellüberständen wurde anschließend die IL-8-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Aus den stimulierten Zellen wurden Zelllysate gewonnen, mit denen in Western Blots die Menge und Phosphorylierung bestimmter zytoplasmatischer Signalproteine untersucht werden konnte.

#### **4.2.1 Die Hemmung von GSK3- $\beta$ in HT-29-Zellen induziert verschiedene zytosolische Signalproteine mit proinflammatorischem Charakter**

In den Western Blots mit Lysaten stimulierter HT-29-Epithelzellen ließen sich mehrere Effekte der verschiedenen Stimuli auf zytoplasmatische Signalproteine beobachten:

Die basale GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung wurde durch LiCl-Inkubation kaum beeinflusst. Nach TNF-Stimulation zeigte sich ein leicht vermindertes pGSK3- $\beta$ -Signal. Eine sehr starke Phosphorylierung der GSK3- $\beta$  wiesen die HT-29-Zellen bei Kostimulation von TNF oder LPS mit LiCl auf, wobei die Phosphorylierung bei Kostimulation von LPS und LiCl tendenziell etwas kräftiger war. (Abbildung 4.5)

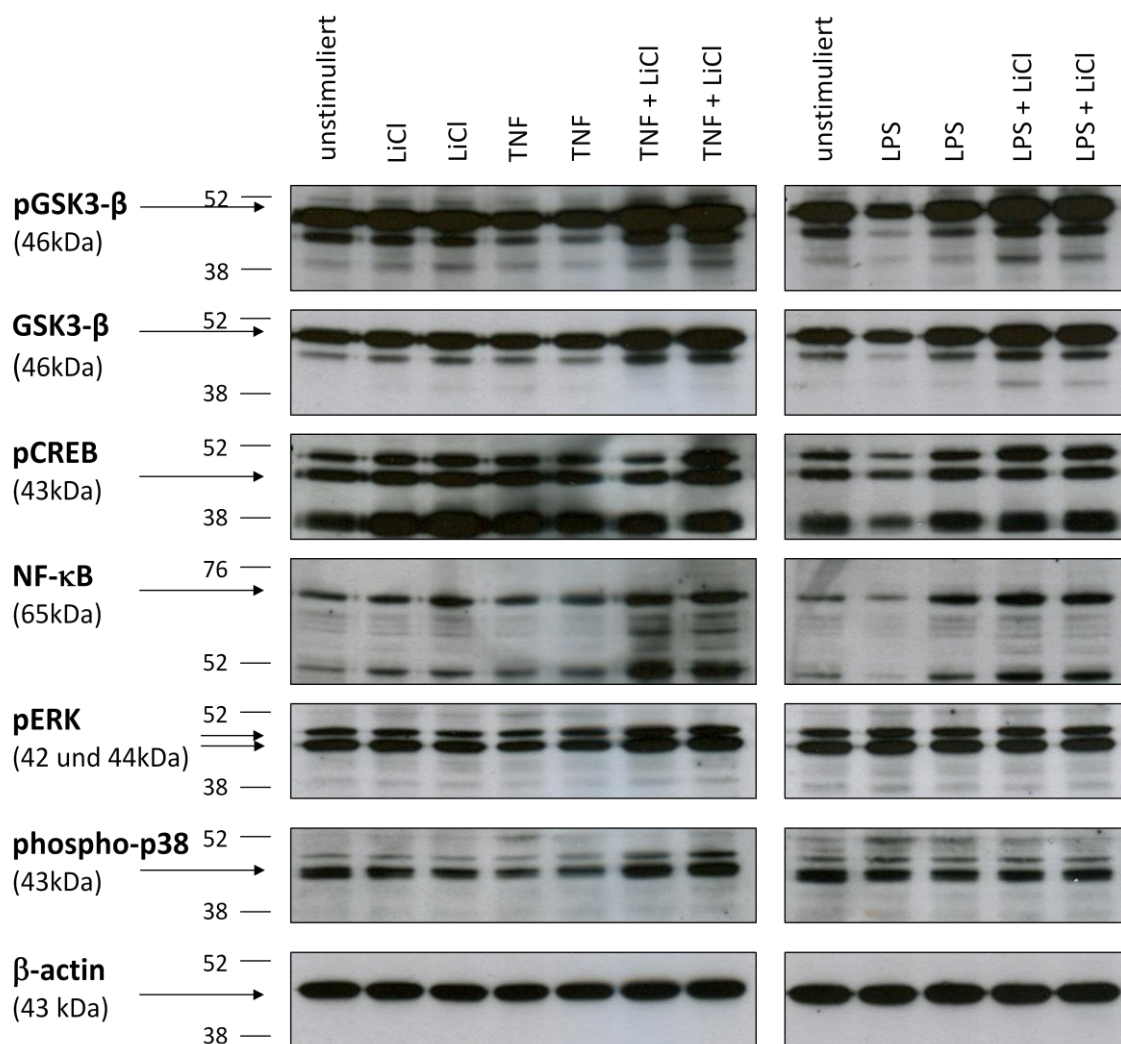
Die Detektion der Gesamt-GSK3- $\beta$  zeigte eine relativ homogene Bandenverteilung für die basale GSK3- $\beta$  sowie für alle Ansätze nach LiCl-, TNF- und LPS-Monoinkubation. Die Kostimulation von TNF oder LPS mit LiCl führte zu einem leichten Anstieg der Gesamtmenge an GSK3- $\beta$ .

Die Bestimmung der aktivierten, phosphorylierten Form des Transkriptionsfaktors CREB (pCREB) lieferte ein relativ gleichmäßiges Verteilungsmuster der Banden für alle Stimulationsbedingungen. Durch die einzelnen Stimulationsbedingungen wurde der Phosphorylierungsgrad von CREB somit nicht moduliert.

Die Gesamtmenge des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B war nach LiCl-Inkubation im Vergleich zu den unstimulierten Proben tendenziell leicht erhöht. Eine besonders starke Induktion von NF- $\kappa$ B in HT-29-Zellen wurde bei Kostimulation von TNF oder LPS mit LiCl beobachtet. (Ko-) Stimulation mit LiCl schien somit die Expression von NF- $\kappa$ B zu steigern.

Als Maß für die Aktivität des zugehörigen MAPK-Signalwegs wurde die Menge an phosphoryliertem und somit aktivem ERK (phospho-p42/p44) bestimmt. Eine verminderte ERK-Phosphorylierung zeigte sich nach TNF-Stimulation. Im Vergleich dazu waren die pERK-Signale nach Kostimulation von TNF und LiCl verstärkt. Für alle übrigen Stimulationsbedingungen wiesen die HT-29-Zellen relativ kontante Mengen an pERK auf.

Die Detektion der aktivierten MAP-Kinase p38 (phospho-p38) zeigte ebenfalls nach TNF-Stimulation verminderte Signale. Sehr intensive Banden an phospho-p38 wurden nach Kostimulation von TNF mit LiCl nachgewiesen. Die übrigen Ansätze wiesen ein sehr homogenes Bandenmuster für phospho-p38 auf.



**Abbildung 4.5: Vergleich der Menge und Phosphorylierung verschiedener zytoplasmatischer Signalproteine in Lysaten von stimulierten HT-29-Zellen mittels Western Blot.** HT-29-Zellen wurden für 24 h mit LPS (10 ng/ml) oder TNF (1 ng/ml) je in An- und Abwesenheit des GSK3-β-Inhibitors LiCl (10 mM) inkubiert. 10 µg Protein.

Trotz einer GSK3-β-Phosphorylierung nach LiCl- (Ko-)Inkubation zeigten sich somit für HT-29-Zellen erhöhte Spiegel des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB nach LiCl-Behandlung. Effekte auf die MAP-Kinasen ERK und p38, deren Aktivierung ebenfalls mit einer Entzündungsreaktion assoziiert ist, wurden nach TNF-Stimulation deutlich. TNF-Monostimulation führte zu einer erniedrigten



Phosphorylierung von ERK und p38, wohingegen LiCl-Kostimulation eine gesteigerte Aktivität dieser MAP-Kinasen zur Folge hatte. Grundsätzlich zeigte sich in diesen Western Blots eine Induktion proinflammatorischer zytosolischer Signalproteine nach Hemmung der GSK3- $\beta$ .

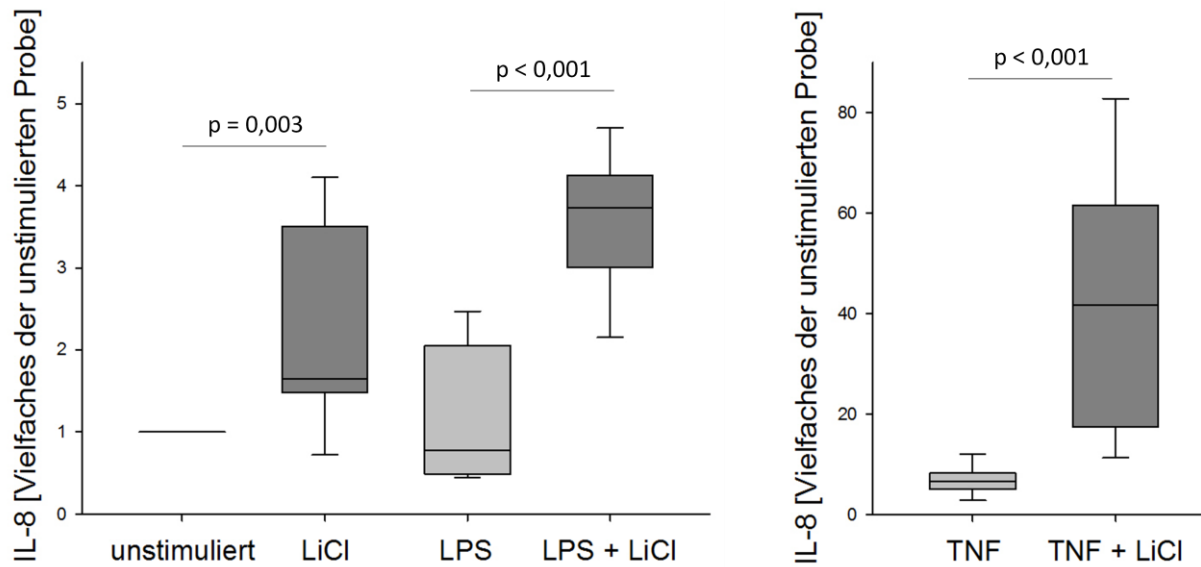
#### **4.2.2 Die Hemmung von GSK3- $\beta$ in HT-29-Zellen induziert die Sekretion von IL-8**

Da in den Western Blots mehrere Effekte der Hemmung von GSK3- $\beta$  auf verschiedene zytoplasmatische Signalproteine nachgewiesen werden konnten, sollte im Folgenden der Einfluss einer GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die Zytokinsekretion der HT-29-Zellen untersucht werden.

Hierzu wurde in den Zellüberständen der stimulierten Zellen der Spiegel des proinflammatorischen Zytokins IL-8 mittels ELISA gemessen.

Die basalen IL-8-Spiegel der HT-29-Zellen lagen im Bereich von 833  $\pm$  576 pg/ml.

Die basale IL-8-Produktion von HT-29-Zellen war unter LiCl-Inkubation auf das 2,2-fache erhöht ( $p=0,003$ ). Die Stimulation mit LPS führte zu keiner signifikanten Steigerung der IL-8-Sekretion. Nach TNF-Stimulation war der IL-8-Spiegel auf das 7,7-fache des basalen Werts erhöht ( $p<0,001$ ). Kostimulation von LPS und LiCl führte zu einem 2,9-fachen Anstieg an IL-8 gegenüber der Monostimulation mit LPS ( $p<0,001$ ). Die TNF-induzierte IL-8-Sekretion wurde durch Koinkubation mit LiCl um das 5,6-fache erhöht ( $p<0,001$ ). (Abbildung 4.6)



**Abbildung 4.6: IL-8 Konzentration in den Zellüberständen der stimulierten HT-29-Zellen bezogen auf die Werte der unstimulierten Ansätze.** HT-29-Zellen wurden für 24h mit LPS (10 ng/ml) oder mit TNF (1 ng/ml) stimuliert; jeweils in An- und Abwesenheit von LiCl (10 mM). Mann-Whitney Rank Sum Test. n=6.

Eine Bestimmung der IL-6-Konzentration in den Zellüberständen stimulierter HT-29-Zellen mittels ELISA wurde ebenfalls durchgeführt. Hier lagen die Werte jedoch unterhalb des Detektionsniveaus. Effekte auf die IL-6-Produktion in HT-29-Zellen konnten somit nicht ermittelt werden.

In den Western Blots und mittels IL-8-ELISA ließen sich deutliche Einflüsse einer GSK3- $\beta$ -Hemmung in HT-29-Zellen sowohl auf die Menge und Phosphorylierung bestimmter zytoplasmatischer Signalproteine als auch auf die Sekretion des Zytokins IL-8 beobachten. Ko-Stimulation von LPS oder TNF mit LiCl führte zwar zu einer gesteigerten Phosphorylierung der GSK3- $\beta$ , was einer Inaktivierung des Enzyms entspricht, aber gleichzeitig wurden für alle Stimulationsbedingungen mit LiCl signifikant gesteigerte Sekretionen des proinflammatorischen Zytokins IL-8 gemessen. Die stärksten Effekte wurden in dieser Versuchsreihe für die TNF-stimulierten Ansätze ermittelt. Nach Kostimulation der HT-29-Zellen mit TNF und LiCl waren aber auch die proinflammatorischen Parameter NF- $\kappa$ B, pERK und phospho-p38 erhöht. Dieser Effekt spiegelte sich in der starken Zunahme an induziertem IL-8 wider.

### **4.3 Modulation der Immunantwort primärer humaner CLPF nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden**

Die GSK3- $\beta$  wurde vor kurzem als ein Regulator der TLR-abhängigen Signaltransduktion nachgewiesen. (siehe 1.5.3)

In diesen Versuchen sollte nun überprüft werden, ob es Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der GSK3- $\beta$  und der Zytokinsekretion bei primären humanen CLPF nach Stimulation mit Liganden verschiedener TLRs gibt.

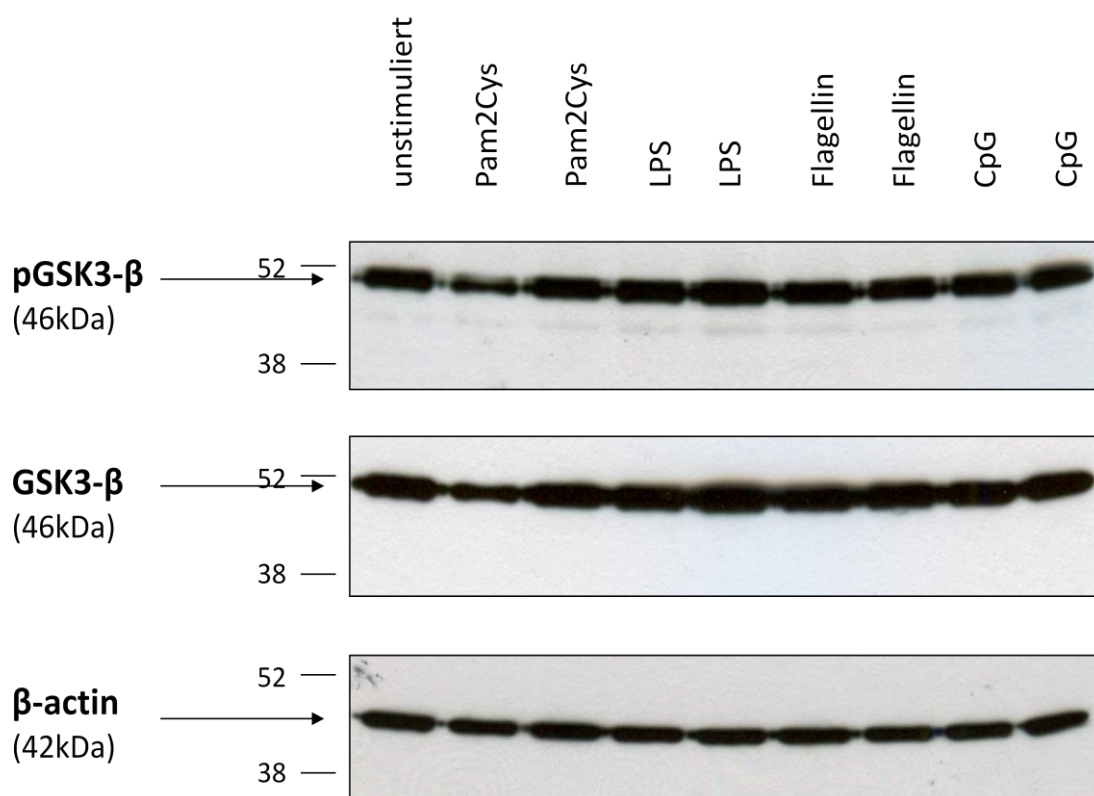
CLPF aus Kontroll-Gewebe wurden hierbei in mehreren Ansätzen für jeweils 24 Stunden mit Pam2CSK<sub>4</sub> (10ng/ml), LPS (10ng/ml), Flagellin (10ng/ml) oder mit CpG (2 $\mu$ g/ml) stimuliert. Die Zellaktivierung erfolgt bei Pam2CSK<sub>4</sub>, einem diacylierten Lipopeptid über TLR2, der hierbei ein Heterodimer mit TLR6 bildet. LPS-Stimulation führt über TLR4, Flagellin-Stimulation über TLR5 und Stimulation mit CpG über TLR9 zu einer Immunreaktion.

#### 4.3.1 Die Phosphorylierung der GSK3- $\beta$ wird durch Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden nicht beeinflusst

Mittels Western Blot wurde der Proteinstatus und der Phosphorylierungsgrad der GSK3- $\beta$  in Zelllysaten stimulierter CLPF bestimmt.

Die Detektion der phosphorylierten Form der GSK3- $\beta$  zeigte ein sehr homogenes Verteilungsmuster der Banden. Es zeigten sich weder Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der GSK3- $\beta$  zwischen unstimulierten und stimulierten Ansätzen noch zwischen den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen. (Abbildung 4.7)

Die Menge an Gesamt-GSK3- $\beta$  war in allen Ansätzen konstant.



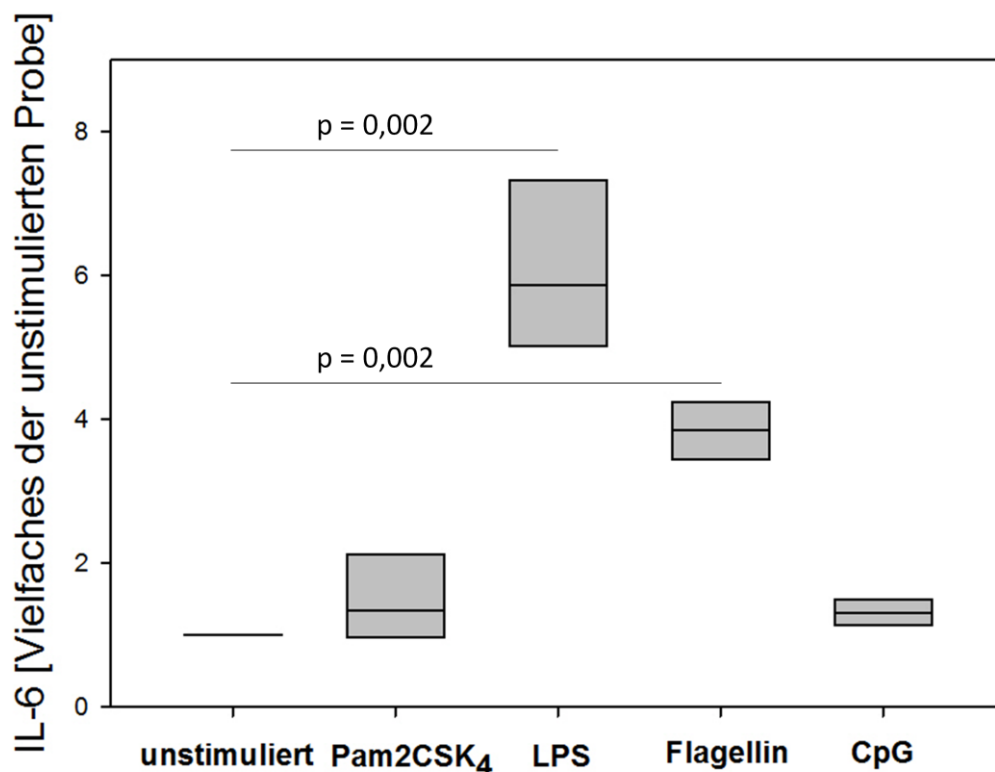
**Abbildung 4.7: Menge und Phosphorylierung der GSK3- $\beta$  in CLPF nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden.** CLPF aus Kontroll-Gewebe wurden für 24h mit den TLR-Liganden Pam2CSK<sub>4</sub> (10ng/ml), LPS (10ng/ml), Flagellin (10ng/ml) und CpG (2ng/ml) stimuliert. 12  $\mu$ g Protein.

### 4.3.2 Die Aktivierung verschiedener TLRs führt zu unterschiedlichen Zytokinantworten

Im nächsten Schritt wurde untersucht, in welchem Maß CLPF nach Stimulation verschiedener TLRs mit einer Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 reagieren.

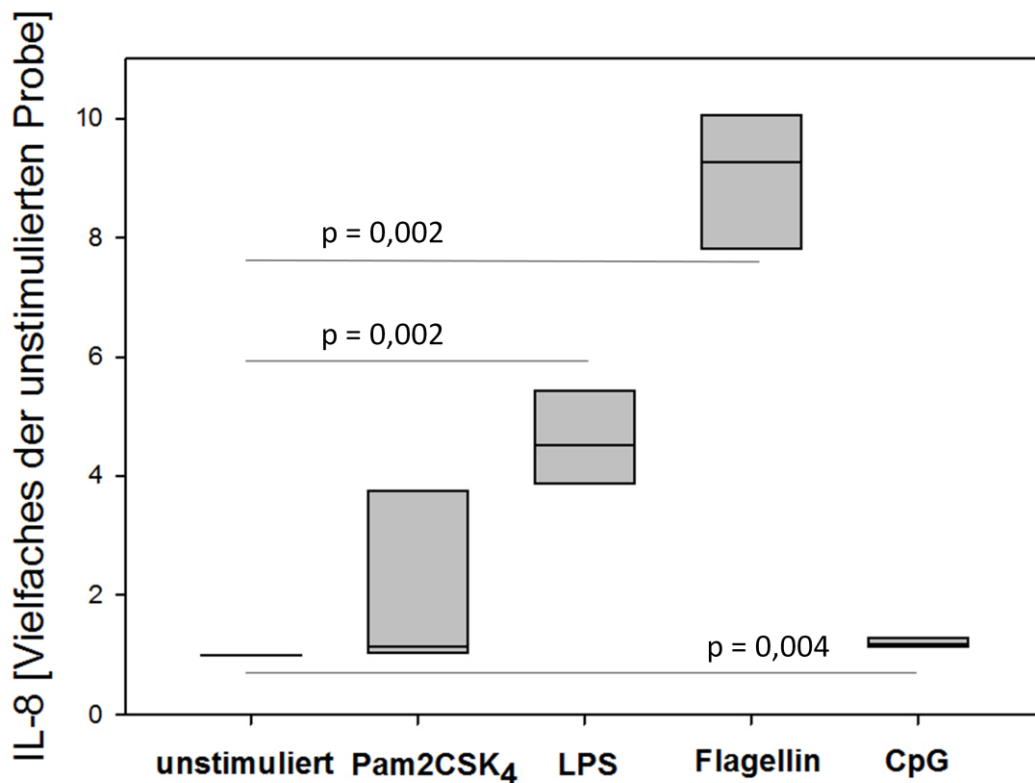
Die basalen IL-6-Werte lagen hierbei im Bereich von  $3,35 \pm 1,81$  pg/ml die basalen IL-8-Konzentrationen lagen bei  $4,45 \pm 1,63$  pg/ml.

Die IL-6-Werte waren nach TLR2-Stimulation mit Pam2CSK<sub>4</sub> (1,5-fach) und nach TLR9-Stimulation mit CpG (1,3-fach) nur leicht erhöht verglichen mit der basalen IL-6-Sekretion. Nach TLR5- Stimulation mit Flagellin wurde ein Anstieg der IL-6-Produktion um 3,8-fache des basalen Werts gemessen ( $p=0,002$ ). Eine IL-6-Induktion auf das 6,1-fache konnte nach TLR4-Stimulation mit LPS nachgewiesen werden ( $p=0,002$ ). (Abbildung 4.8)



**Abbildung 4.8: IL-6 Sekretion nach Stimulation primärer humaner CLPF mit verschiedenen TLR-Liganden.** CLPF aus Kontroll-Gewebe wurden für 24h mit den TLR-Liganden Pam2CSK<sub>4</sub> (10ng/ml), LPS (10ng/ml), Flagellin (10ng/ml) und CpG (2ng/ml) stimuliert. Die IL-6-Sekretion wurde in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen. Mann-Whitney Rank Sum Test.  $n=3$ .

Auch bei der Messung der IL-8-Sekretion konnte nur ein geringer Anstieg nach TLR2-Stimulation mit Pam2CSK<sub>4</sub> (2-fach) und nach TLR9-Stimulation mit CpG (1,2-fach,  $p=0,004$ ) beobachtet werden. TLR4-Stimulation mit LPS führte zu einer 4,7-fachen Zunahme der IL-8-Produktion ( $p=0,002$ ). Nach TLR5-Stimulation mittels Flagellin konnte ein 9,1-facher Anstieg der IL-8-Sekretion nachgewiesen werden ( $p=0,002$ ). (Abbildung 4.9)



**Abbildung 4.9: IL-8 Sekretion nach Stimulation primärer humaner CLPF mit verschiedenen TLR-Liganden.** CLPF aus Kontroll-Gewebe wurden für 24h mit den TLR-Liganden Pam2CSK<sub>4</sub> (10ng/ml), LPS (10ng/ml), Flagellin (10ng/ml) und CpG (2ng/ml) stimuliert. Die IL-6-Sekretion wurde in den Zellüberständen mittels ELISA gemessen. Mann-Whitney Rank Sum Test.  $n=3$ .

Die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 wurde somit in unterschiedlicher Weise durch die Aktivierung verschiedener TLR beeinflusst. Durch Stimulation der Rezeptoren TLR2 und TLR9 konnte jeweils nur ein geringer Anstieg von IL-6 und IL-8 erreicht werden. Nach TLR4- und TLR5-Stimulation war sowohl die IL-6 als auch die IL-8-Sekretion signifikant erhöht. Die TLR4-Stimulation hatte die deutlichste IL-6-Induktion zur Folge, wohingegen die höchste IL-8-Sekretion bei TLR5-Stimulation erreicht wurde.

## 4.4 Modulation der Immunantwort primärer humaner CLPF durch GSK3- $\beta$ Inhibition

Im Hauptteil dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich Entzündungsreaktionen primärer humaner CLPF durch Blockierung der GSK3- $\beta$  beeinflussen lassen. In *in vitro* Stimulationsexperimenten wurde getestet, ob eine durch TNF oder LPS induzierte Immunantwort durch Inhibition der GSK3- $\beta$  moduliert werden kann und inwiefern intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse durch Hemmung der GSK3- $\beta$  beeinflusst werden.

Hierzu wurden primäre humane CLPF verwendet, die aus Darm-Resektaten von Kontroll-, MC- und CU-Patienten isoliert wurden. Diese Zellen wurden für je 24 Stunden in An- und Abwesenheit des GSK3- $\beta$ -Inhibitors LiCl (10 mM) mit TNF (1 ng/ml) als endogenem Zytokin oder LPS (10 ng/ml) als TLR4-Ligand stimuliert.

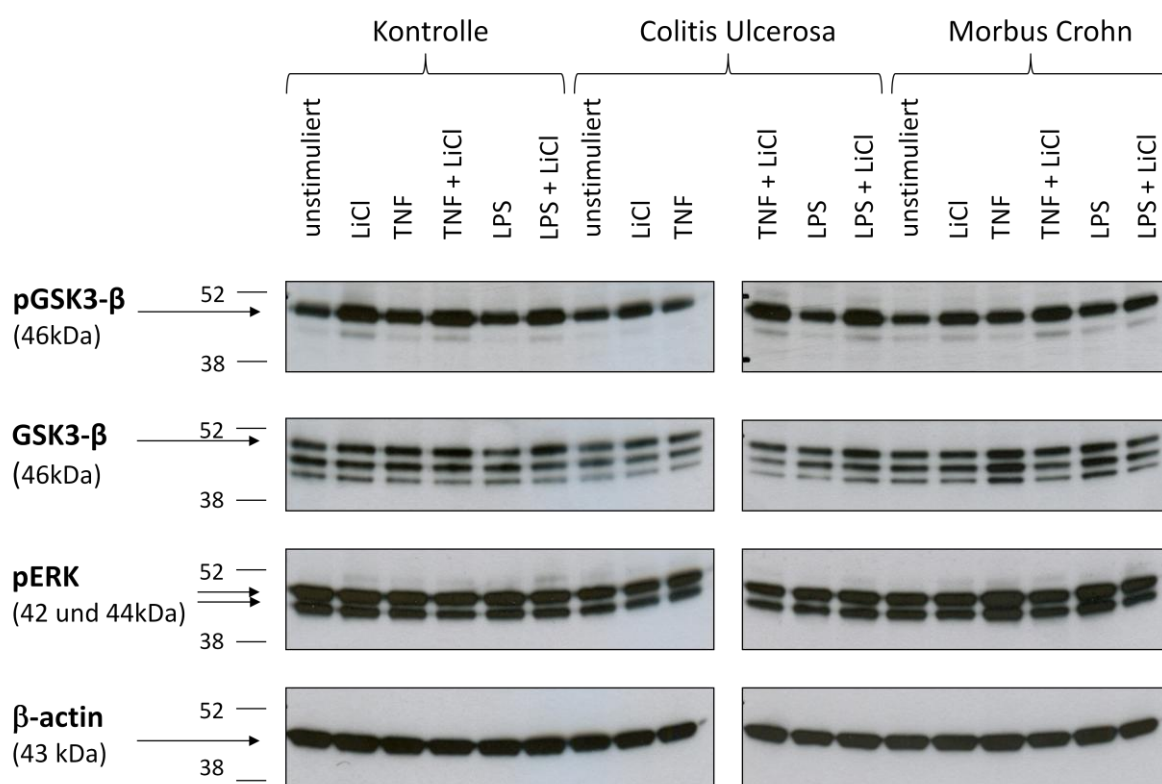
Nach Stimulation wurden die Zellüberstände abgenommen und darin die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) mittels ELISA bestimmt. Aus stimulierten Zellen wurden Zell-Lysate hergestellt, womit in Western Blots der Proteinstatus und Phosphorylierungsgrad der GSK3- $\beta$  sowie der Status von pERK als Mitglied der MAPK-Familie bestimmt wurde. Anschließend wurden in separaten Versuchen nach Stimulation Zellkernextrakte der CLPF gewonnen und darin die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB mittels DNA-Bindungsassays untersucht.

### 4.4.1 LiCl-Inkubation induziert die Phosphorylierung von GSK3- $\beta$ in primären humanen CLPF von Kontroll- und CED-Patienten

Die LiCl (Ko-)Stimulation induzierte die Phosphorylierung und somit die Inaktivierung von GSK3- $\beta$  sowohl in Kontroll- als auch in CED-CLPF. Auch nach TNF- und LPS-Stimulation wurde eine leichte Induktion der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung beobachtet, was auf eine protektive, antiinflammatorische Gegenreaktion nach induzierter Entzündung schließen lässt. (Abbildung 4.10)

Die Gesamtmenge an GSK3- $\beta$  wurde durch die unterschiedlichen Stimulationsbedingungen nicht beeinflusst. CU-CLPF schienen geringere Spiegel an Gesamt-GSK3- $\beta$  aufzuweisen als Kontroll- und MC-CLPF.

Die Detektion von phosphoryliertem und somit aktivem ERK (phospho-p42/p44), einer MAP-Kinase, deren Aktivierung eine Phosphorylierung und somit Inaktivierung der GSK3- $\beta$  zur Folge haben kann, zeigte für Kontroll- und CU-CLPF keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationsbedingungen. Bei MC-CLPF wurde eine Induktion von pERK nach TNF- und LPS-Stimulation beobachtet.



**Abbildung 4.10: Vergleich des Proteinstatus und Phosphorylierungsgrads der GSK3- $\beta$  und des Status von pERK in stimulierten primären humanen CLPF mittels Western Blot.** CLPF von Kontroll-, CU- und MC-Patienten wurden für 24 h mit LPS (10 ng/ml) oder TNF (1 ng/ml) je in An- und Abwesenheit des GSK3- $\beta$ -Inhibitors LiCl (10 mM) inkubiert. 10  $\mu$ g Protein.

LiCl-Behandlung scheint somit in primären humanen CLPF eine effektive Hemmung der GSK3- $\beta$  durch Phosphorylierung zu bewirken.

In MC-CLPF lässt sich bei Kontakt mit inflammatorischen Stimuli eine erhöhte Aktivität der MAP-Kinase ERK induzieren, was auf eine proinflammatorische Immunreaktion schließen lässt.



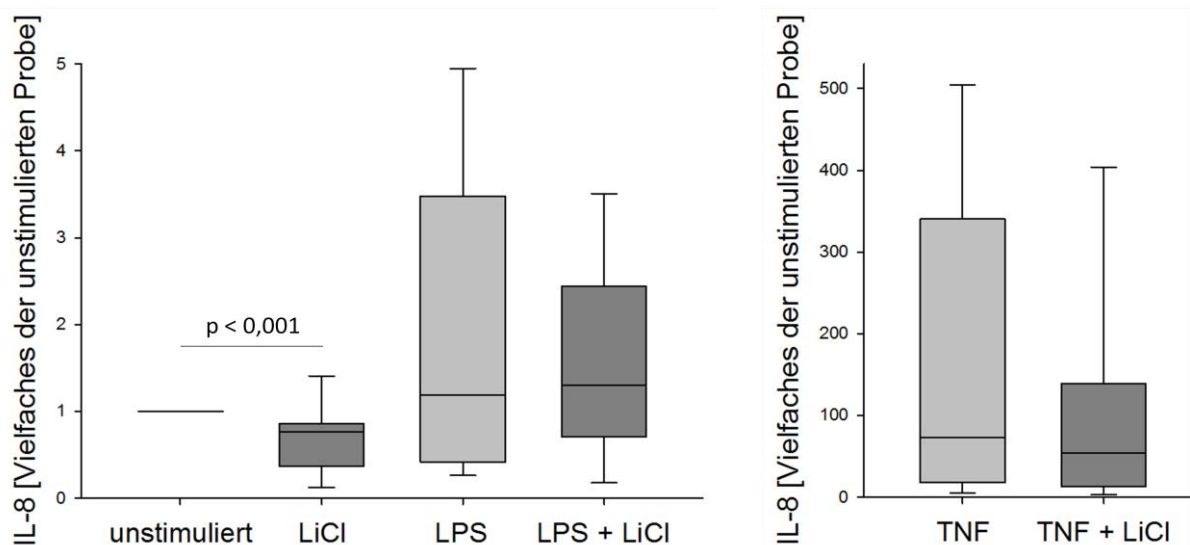
#### 4.4.2 Die Hemmung von GSK3- $\beta$ führt zu einer verminderten Sekretion von Interleukin-8 vorwiegend in MC-CLPF

Die basalen IL-8-Spiegel lagen für Kontroll-CLPF im Bereich von 437  $\pm$  892 pg/ml für CU-CLPF im Bereich von 436  $\pm$  686 pg/ml und für MC-CLPF bei 580  $\pm$  539 pg/ml.

Aufgrund der hohen Standardabweichung bei primären CLPF von verschiedenen Patienten werden im Folgenden die gemessenen Zytokin-Werte relativ bezogen auf die basalen Werte der jeweiligen Zellen dargestellt.

Durch Inkubation mit LiCl konnte bereits die basale IL-8-Sekretion bei Kontroll-CLPF um 31% signifikant erniedrigt werden ( $p < 0,001$ ). Nach TNF-Stimulation der Kontroll-CLPF wurde ein im Durchschnitt 168-facher Anstieg an IL-8 beobachtet ( $p < 0,001$ ). Nach LPS-Stimulation waren die IL-8-Werte durchschnittlich 2-fach erhöht, der Median lag jedoch nur geringfügig höher. (Abbildung 4.11)

Die TNF-induzierte IL-8-Sekretion wurde durch LiCl-Kostimulation um 27% gesenkt. Für die LPS-stimulierten Ansätze wurde eine Reduktion von 13% bei Kostimulation mit LiCl gemessen. Durch Hemmung der GSK3- $\beta$  in Kontroll-CLPF konnte somit zwar die basale, nicht aber die durch inflammatorische Stimuli induzierte IL-8-Sekretion, signifikant gesenkt werden.

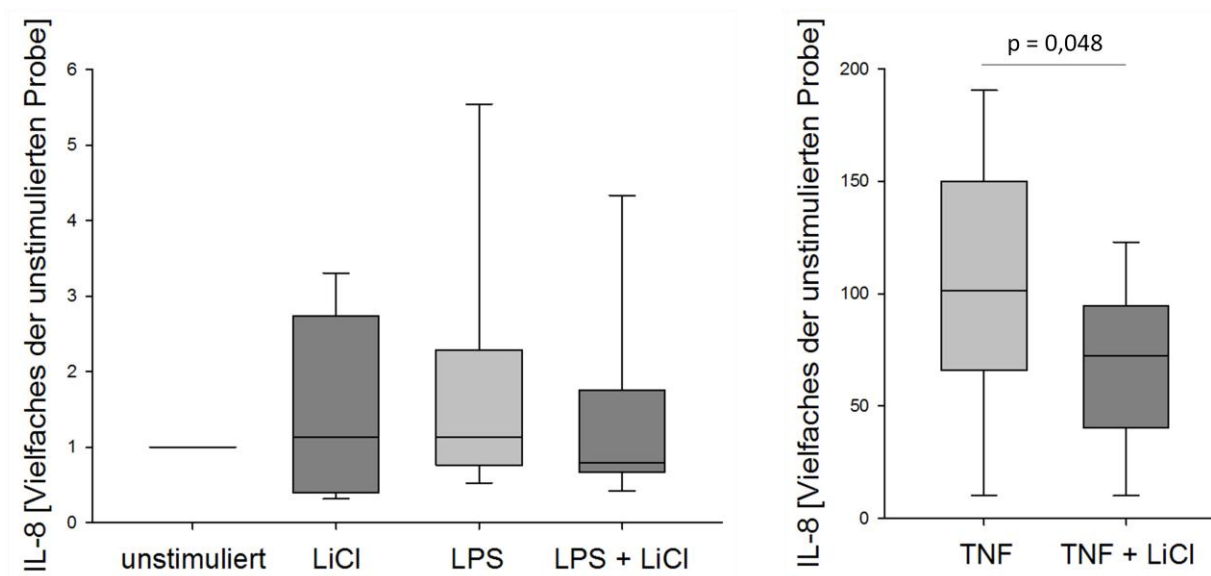


**Abbildung 4.11: Einfluss der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die Interleukin-8 Sekretion von Kontroll-CLPF.** CLPF von Kontroll-Patienten wurden für 24h mit LPS (10 ng/ml) oder mit TNF (1 ng/ml) in An- und Abwesenheit von LiCl (10 mM) stimuliert. Mann-Whitney Rank Sum Test.  $n=17-21$ .

Die basale IL-8-Sekretion der CU-CLPF konnte durch LiCl nicht gesenkt werden. Nach Stimulation mit LPS war die IL-8-Sekretion der CU-CLPF 1,9-fach erhöht. Die TNF-induzierte IL-8-Sekretion stieg um das 103-fache gegenüber den unstimulierten Ansätzen an ( $p < 0,001$ ).

In den LPS-stimulierten Ansätzen konnte die IL-8-Sekretion durch LiCl um 21% gesenkt werden. Die TNF-induzierte IL-8-Sekretion war bei Blockade der GSK3- $\beta$  mit LiCl um 33% signifikant vermindert ( $p = 0,048$ ). (Abbildung 4.12)

Bei CU-CLPF zeigten sich somit relativ geringe Effekte der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf den basalen sowie auf den LPS-induzierten IL-8-Spiegel. Nur die TNF-induzierte IL-8-Immunantwort konnte mit LiCl signifikant reduziert werden.

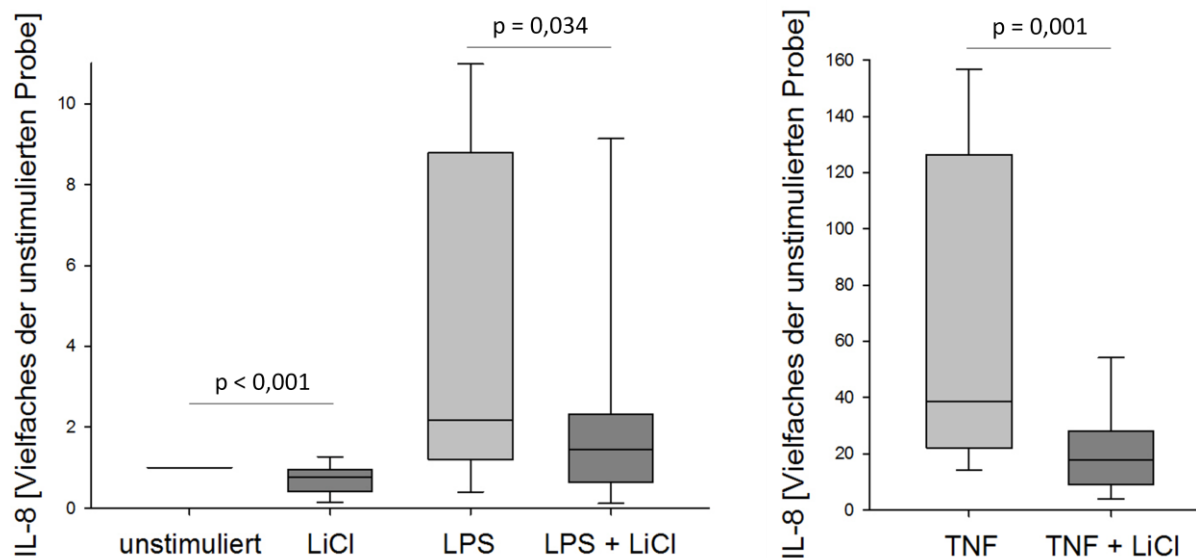


**Abbildung 4.12: Einfluss der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die Interleukin-8 Sekretion von CU-CLPF.** CLPF von CU-Patienten wurden für 24h mit LPS (10 ng/ml) oder mit TNF (1 ng/ml) in An- und Abwesenheit von LiCl (10 mM) stimuliert. Mann-Whitney Rank Sum Test.  $n=11-12$ .

Bei MC-CLPF wurde der basale IL-8-Spiegel bei Inkubation mit LiCl um 30% signifikant gesenkt ( $p < 0,001$ ). Nach LPS-Stimulation stiegen die IL-8-Werte durchschnittlich um das 4,5-fache des basalen IL-8-Spiegels ( $p < 0,001$ ). Nach TNF-Stimulation zeigte sich ein im Vergleich zu den Kontroll-CLPF deutlich geringerer IL-8-Anstieg auf das 67-fache des basalen Werts ( $p < 0,001$ ).

Die LPS-induzierte IL-8-Sekretion wurde bei GSK3- $\beta$ -Blockade mit LiCl um 50% vermindert ( $p = 0,034$ ). Nach TNF-Stimulation konnte eine Reduktion des IL-8-Spiegels von 68% bei LiCl-Kostimulation nachgewiesen werden ( $p = 0,001$ ). (Abbildung 4.13)

Bei den MC-CLPF zeigte sich hiermit der größte Effekt der GSK3- $\beta$ -Blockade mittels LiCl auf die IL-8-Sekretion. Sowohl die basale als auch die induzierte IL-8-Sekretion konnte durch Inhibition der GSK3- $\beta$  signifikant gesenkt werden.



**Abbildung 4.13: Einfluss der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die Interleukin-8 Sekretion von MC-CLPF.** CLPF von MC-Patienten wurden für 24h mit LPS (10 ng/ml) oder mit TNF (1 ng/ml) in An- und Abwesenheit von LiCl (10 mM) stimuliert. Mann-Whitney Rank Sum Test.  $n=10$ .

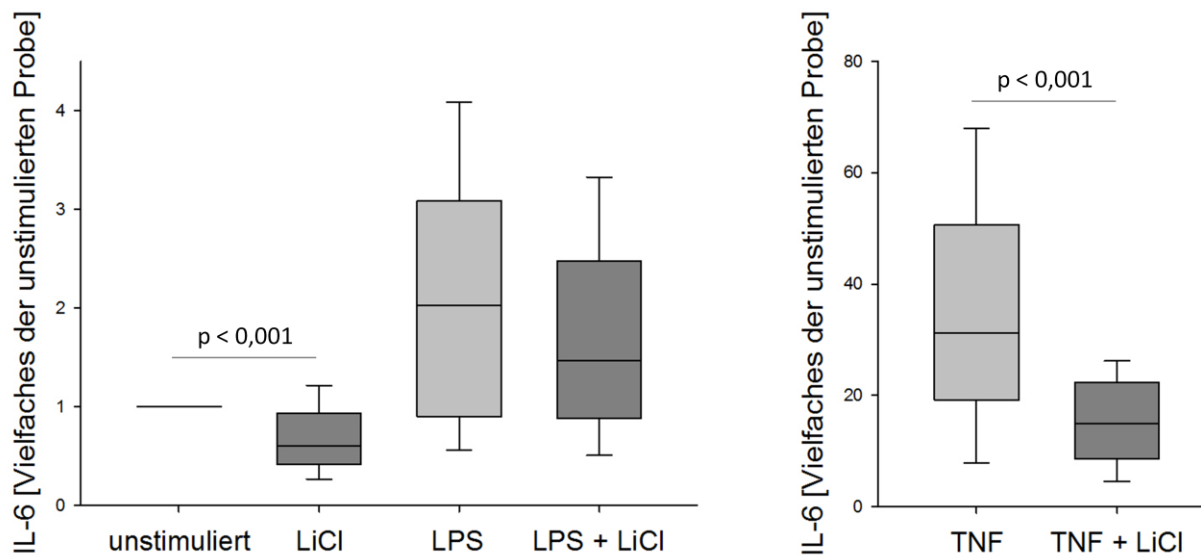
#### 4.4.3 Die Hemmung von GSK3- $\beta$ führt zu einer verminderten Sekretion von Interleukin-6 in stimulierten primären humanen CLPF

Die basale IL-6-Sekretion lag für Kontroll-CLPF im Bereich von 116  $\pm$  151 pg/ml und für CU-CLPF bei 172  $\pm$  125 pg/ml. Bei MC-CLPF lag die basale IL-6-Produktion höher im Bereich von 332  $\pm$  263 pg/ml.

Durch GSK3-Blockade mit LiCl wurde die basale IL-6-Sekretion von Kontroll-CLPF um 32% signifikant reduziert ( $p < 0,001$ ). Eine Stimulation mit LPS führte zu einer 2,2-fachen ( $p < 0,001$ ), eine Stimulation mit TNF zu einer 26-fachen Steigerung ( $p < 0,001$ ) der IL-6-Produktion.

Die LPS-induzierte IL-6-Sekretion war in Gegenwart von LiCl um 21%, die TNF-induzierte IL-6-Produktion um 56% reduziert ( $p < 0,001$ ). (Abbildung 4.14)

Durch Hemmung von GSK3- $\beta$  wird somit die IL-6-Antwort von Kontroll-CLPF auf inflammatorische Stimuli reduziert.

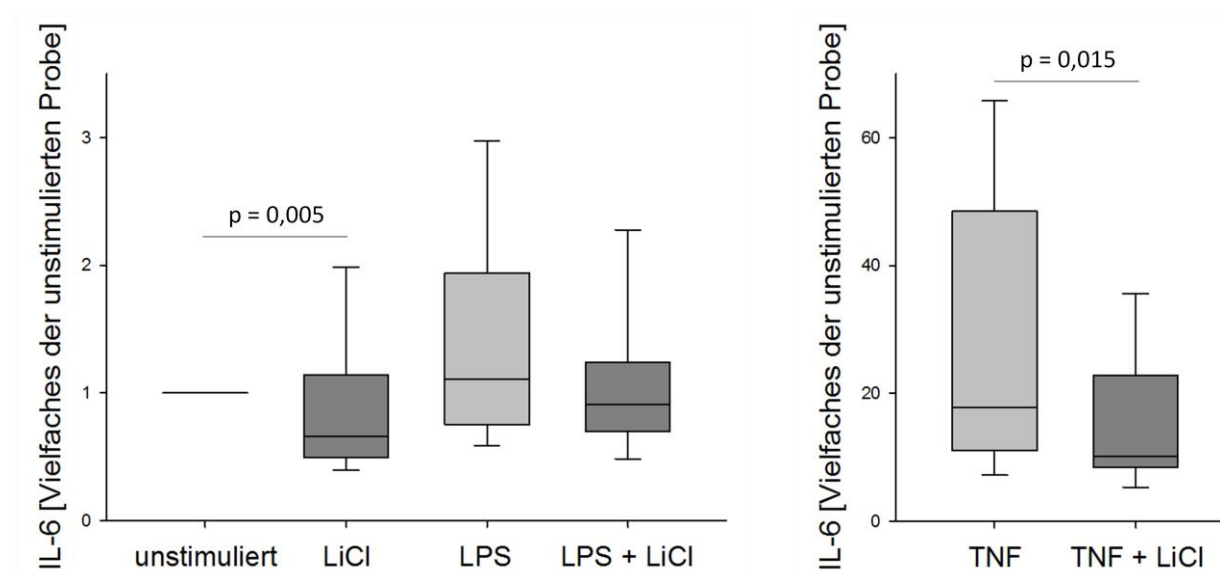


**Abbildung 4.14: Einfluss der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die Interleukin-6 Sekretion von Kontroll-CLPF.** CLPF von Kontroll-Patienten wurden für 24h mit LPS (10 ng/ml) oder mit TNF (1 ng/ml) in An- und Abwesenheit von LiCl (10 mM) stimuliert. Mann-Whitney Rank Sum Test. n=18-23.

Die basale IL-6-Sekretion von CU-CLPF konnte nach LiCl-Inkubation um 10% signifikant gesenkt werden ( $p=0,005$ ). Nach TNF-Stimulation stiegen die Werte um das 28-fache an im Vergleich zu den basalen Werten ( $p<0,001$ ). Nach LPS-Stimulation war der IL-6-Anstieg jedoch relativ gering (1,4-fach).

Die LPS-induzierte IL-6-Sekretion war nach LiCl-Koinkubation um 20% vermindert. Nach GSK3- $\beta$ -Blockade bei TNF-Stimulation wurde eine signifikante Reduktion der IL-6-Produktion von 46% gemessen ( $p=0,015$ ). (Abbildung 4.15)

Eine Hemmung der GSK3- $\beta$  kann somit bei CU-CLPF signifikant Einfluss nehmen auf den basalen sowie auf den TNF-induzierten IL-6-Spiegel.

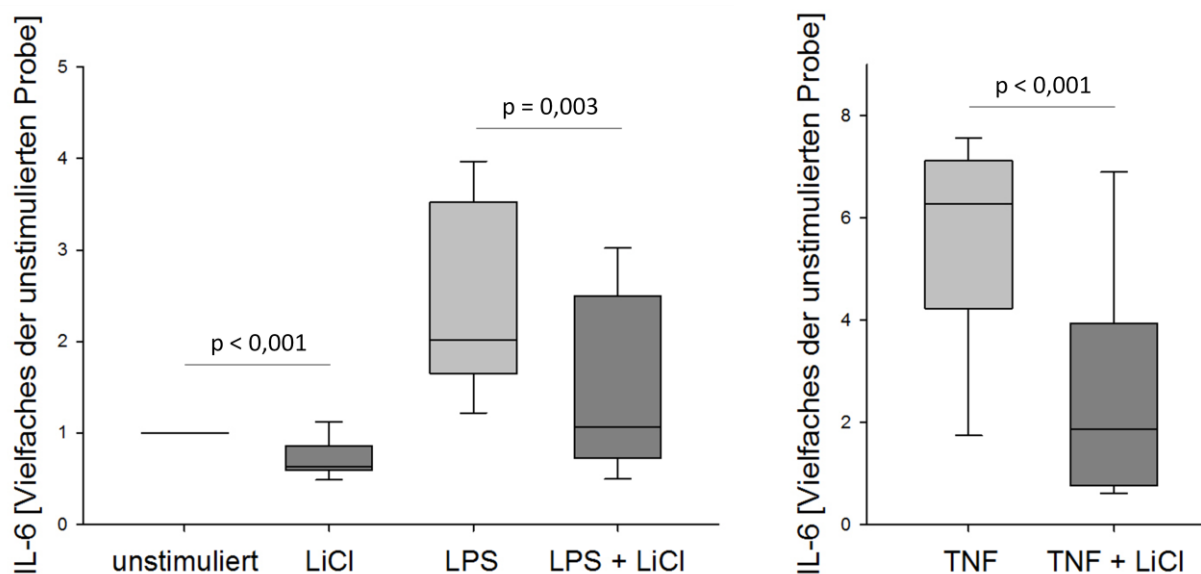


**Abbildung 4.15: Einfluss der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die Interleukin-6 Sekretion von CU-CLPF.** CLPF von CU-Patienten wurden für 24h mit LPS (10 ng/ml) oder mit TNF (1 ng/ml) in An- und Abwesenheit von LiCl (10 mM) stimuliert. Mann-Whitney Rank Sum Test.  $n=11-12$ .

Die Hemmung der GSK3- $\beta$  mittels LiCl reduzierte die basale IL-6-Produktion von MC-CLPF um 29% ( $p < 0,001$ ). Nach LPS-Stimulation stieg die IL-6-Sekretion auf das 2,4-fache des basalen Wertes ( $p < 0,001$ ). Der TNF-induzierte IL-6-Spiegel war bei den MC-CLPF jedoch nur um das 5,6-fache erhöht ( $p < 0,001$ ) und somit deutlich schwächer als bei Kontroll- und CU-CLPF.

Nach Kostimulation mit LiCl war die LPS-induzierte IL-6-Sekretion um 41% signifikant reduziert ( $p = 0,003$ ). Die TNF-induzierte IL-6-Sekretion konnte mit LiCl um 52% gesenkt werden ( $p < 0,001$ ). (Abbildung 4.16)

Durch Hemmung der GSK3- $\beta$  in MC-CLPF wird sowohl die basale als auch die TNF- und LPS-induzierte IL-6-Antwort somit effektiv abgeschwächt.



**Abbildung 4.16: Einfluss der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die Interleukin-6 Sekretion von MC-CLPF.** CLPF von MC-Patienten wurden für 24h mit LPS (10 ng/ml) oder mit TNF (1 ng/ml) in An- und Abwesenheit von LiCl (10 mM) stimuliert. Mann-Whitney Rank Sum Test.  $n=10$ .

Sowohl die basale als auch die induzierte Sekretion von IL-8 und IL-6 ließ sich bei CLPF von Kontroll- und MC-CLPF durch Hemmung der GSK3- $\beta$  mit LiCl beeinflussen. Es zeigten sich aber deutliche Unterschiede in der Effektivität und dem Grad der Zytokinreduktion. Grundsätzlich wurden für IL-8 und IL-6 sehr ähnliche Tendenzen hinsichtlich der Einflussnahme von LiCl beobachtet. Den deutlich

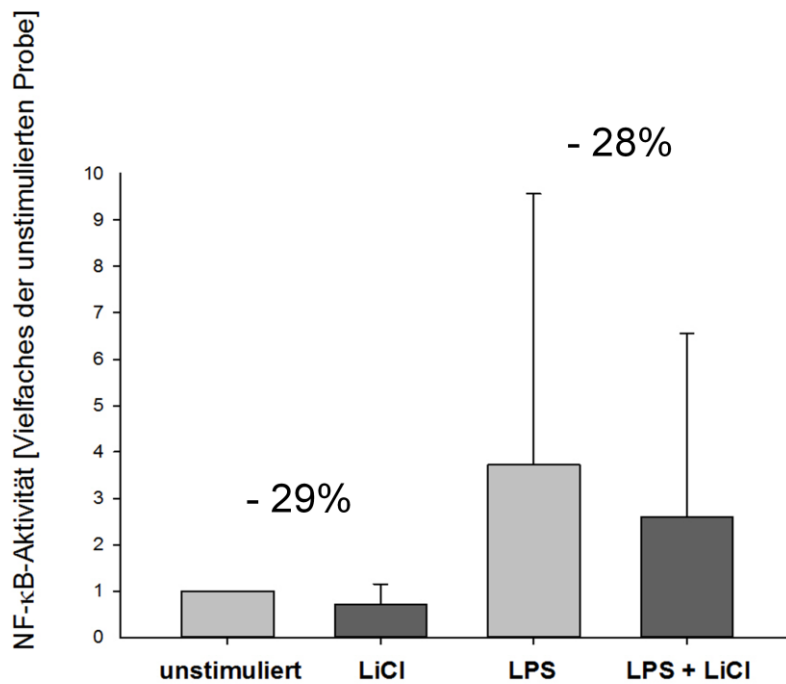
stärkeren reduktiven Effekt schien die GSK3- $\beta$ -Hemmung auf die Sekretion von IL-6 zu nehmen. Auch zwischen Kontroll-, CU- und MC-CLPF gab es eindeutige Unterschiede. CLPF von MC-Patienten zeigten im Gegensatz zu Kontroll und v.a. zu CU-CLPF für alle Stimulationsbedingungen eine signifikante und sehr viel ausgeprägtere Reduktion von IL-6 und IL-8 nach LiCl-Behandlung. Eine Hemmung der GSK3- $\beta$  scheint also besonders bei MC-CLPF einen protektiven Effekt vor einer übermäßigen Immunreaktion bei Kontakt mit inflammatorischen Stimuli zu bieten.

#### **4.4.4 Einfluss der GSK3- $\beta$ -Hemmung auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren**

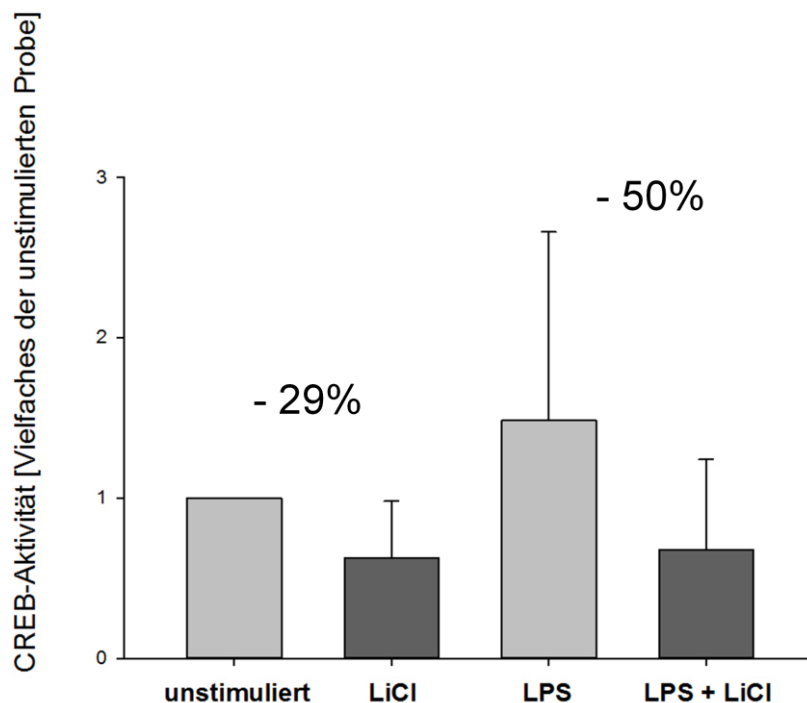
Da sich nach Blockierung von GSK3- $\beta$  mit LiCl in primären humanen CLPF deutliche Effekte auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nachweisen ließen, sollte nun untersucht werden, ob diese Effekte durch eine Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren zustande kommen. Von besonderem Interesse waren hierbei die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB, die in gesunden Zellen proinflammatorische (NF- $\kappa$ B) und antiinflammatorische (CREB) Immunreaktionen im Gleichgewicht halten. Die GSK3- $\beta$  scheint Einfluss auf dieses Gleichgewicht zu nehmen.

Durch Blockade der GSK3- $\beta$  mit LiCl wurde die basale Aktivität von NF- $\kappa$ B um 29% vermindert. Die Stimulation mit LPS führte zu einer 3,7-fachen Erhöhung der DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B. In Gegenwart von LiCl war die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivität jedoch um 28% reduziert. (Abbildung 4.17)

Auch die basale Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB war nach Inkubation mit LiCl um 29% vermindert. Nach Stimulation mit LPS zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der DNA-Bindung von CREB um das 1,5-fache des basalen Werts. Die LPS-induzierte CREB-Aktivität wurde durch LiCl-Kostimulation um 50% vermindert. (Abbildung 4.18)



**Abbildung 4.17: Einfluss der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität.** Primäre humane CLPF wurden jeweils für 24 h mit LPS (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von LiCl (10 mM) stimuliert. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wurde mittels DNA-Bindungsassays ermittelt. n=3.



**Abbildung 4.18: Einfluss der GSK3- $\beta$ -Inhibition auf die CREB-Aktivität.** Primäre humane CLPF wurden jeweils für 24 h mit LPS (10 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von LiCl (10 mM) stimuliert. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB wurde mittels DNA-Bindungsassays bestimmt. n=3



## 5 Diskussion

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind gekennzeichnet durch eine chronisch-rezidivierende bzw. chronisch-persistierende intestinale Entzündung. Trotz des stetigen Fortschritts in der Pharmakotherapie und mehrerer immunsuppressiver Strategien ist eine Heilung immer noch nicht möglich. Zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist die Kenntnis der beteiligten Signalwege und ihre unterschiedliche Regulation in gesundem und in chronisch entzündetem Gewebe von entscheidender Bedeutung.

Für das Fortschreiten von chronisch intestinalen Entzündungen scheint eine Dysregulation der TLR-vermittelten Immunantwort nach Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen eine wichtige Rolle zu spielen. Die genauen Mechanismen sind bisher noch unbekannt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die GSK3- $\beta$  ein wichtiges Regulationsprotein für inflammatorische Prozesse in primären humanen CLPF ist. Durch Hemmung der GSK3- $\beta$  gelingt es, eine übermäßige Entzündungsreaktion zu verhindern.

Der menschliche Darm enthält eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, die an intestinalen Entzündungsprozessen in unterschiedlicher Weise beteiligt sind. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist die Regulation pro- und anti-inflammatorischer Prozesse im Darm gestört. Ein mögliches Schlüsselprotein, das für eine Dysregulation der physiologischen Prozesse bei CED verantwortlich sein könnte, ist die GSK3- $\beta$ . GSK3- $\beta$  fördert in ihrer aktiven Form in Monozyten die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12, TNF und IFN- $\gamma$ , während die Produktion von anti-inflammatorischem IL-10 blockiert wird.<sup>80,85</sup> Nach TLR-Aktivierung wird die GSK3- $\beta$  durch Phosphorylierung an Ser9<sup>92</sup> inaktiviert.<sup>85</sup> Der Aktivierungsstatus von GSK3- $\beta$  könnte somit ein Maß für den pro- bzw. anti-inflammatorischen Phänotyp einer Zelle darstellen. Obwohl mittels Western Blots kein quantitativer Nachweis der genauen Proteinmenge möglich ist, kann der Proteingehalt einer Probe allerdings qualitativ nachgewiesen werden und semiquantitativ mit weiteren Proben verglichen werden.

Die Messung der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in Gesamtgewebe des menschlichen Darms könnte aus diesem Grund herangezogen werden, um grundsätzliche Tendenzen einer gesteigerten bzw. erniedrigten Aktivität der GSK3- $\beta$  zwischen Kontroll- und CED-Patienten nachzuweisen. Es lassen sich allerdings keine

Aussagen darüber machen, in welchen Zellen Unterschiede im Phosphorylierungsgrad besonders stark oder unter Umständen gar nicht vorhanden sind. Die Phosphorylierung von GSK3- $\beta$  in Gesamtmukosagewebe von Kontroll- und CED-Patienten ergab ein sehr heterogenes Muster. Eine einheitliche Tendenz zu einer grundsätzlichen erhöhten oder verminderten GSK3- $\beta$ -Aktivierung war nicht zu erkennen. Zum Phosphorylierungsgrad der GSK3- $\beta$  in Gesamtgewebe des menschlichen Kolons scheinen also noch weitere Faktoren beizutragen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die unterschiedliche medikamentöse Vorbehandlung der Patienten sein. Möglicherweise gab es auch Unterschiede im Entzündungsgrad des Darmmaterials der CED-Patienten bzw. der Kontroll-Patienten. Grundsätzliche Unterschiede in der GSK3- $\beta$ -Aktivierung zwischen CED- und Kontroll-Patienten scheint es somit in dem in dieser Arbeit untersuchten Gesamt-Gewebe nicht zu geben.

Da es sich beim Darm nicht um eine homologe Zellpopulation handelt, könnten in verschiedenen Zellen unterschiedliche Stoffwechsel- und Signalwege am chronischen Entzündungsprozess beteiligt sein. Allerdings können auch dieselben Stimuli unterschiedliche Reaktionen in den einzelnen Zelltypen hervorrufen. So war bei den verschiedenen Zellpopulationen des Darms die GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in unterschiedlicher Weise von mehreren Faktoren abhängig. Bei Kolonepithelzellen zeigte sich tendenziell eine verminderte Phosphorylierung der GSK3- $\beta$  in CED-Gewebe, wohingegen die Phosphorylierung in Kolonepithelzellen aus Kontroll-Gewebe relativ stark war. Da die Gesamt-GSK3- $\beta$ -Menge konstant war, scheint die GSK3- $\beta$  in Kolonepithelzellen aus CED-Gewebe eine hohe Aktivität aufzuweisen. Bei CLPF war die GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung konstant bei Kontroll- und CED-CLPF. Die Grundmenge an phosphorylierter GSK3- $\beta$  in CLPF scheint nicht durch eine CED-Erkrankung beeinflusst zu sein. Da es sich bei den CLPF um primäre Zellen in Zellkultur handelt, die über einen Kultivierungsprozess von mehreren Passagen gewonnen wurden, könnte das homogenen Phosphorylierungsmuster der CLPF-Proben allerdings auch durch den Isolierungsprozess bedingt sein. Die Untersuchung primärer humaner LPMZ hinsichtlich der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung zeigte ein recht heterogenes Bandenverteilungsmuster sowohl von pGSK3- $\beta$  als auch von Gesamt-GSK3- $\beta$ . Da die Aktivität der GSK3- $\beta$  nicht über Translation (Proteinsynthese) sondern hauptsächlich über die Phosphorylierung reguliert wird<sup>67</sup>,

lässt der Western Blot nur eingeschränkte Aussagen zu. Bei primären humanen LPMZ scheint der Status der GSK3- $\beta$  jedoch durch die Art der CED-Erkrankung beeinflusst zu sein. MC-LPMZ wiesen stärkere, CU-LPMZ wiesen schwächere pGSK3- $\beta$ - und Gesamt-GSK3- $\beta$ -Signale auf. Die Untersuchung des GSK3- $\beta$ -Status in unstimulierten primären Zellpopulationen des menschlichen Darms ergab somit keine einheitliche Tendenz. Die GSK3- $\beta$  ist bei CED in den verschiedenen Zelltypen möglicherweise in unterschiedlicher Weise durch chronische Entzündungsprozesse beeinflusst.

Da die Western Blot-Ergebnisse mit unstimulierten primären Kolonepithelzellen Hinweise darauf gaben, dass die Aktivität der GSK3- $\beta$  in entzündeten CED-Kolonepithelzellen erhöht ist, wurde in Stimulationsversuchen mit HT-29-Zellen der Einfluss einer GSK3- $\beta$ -Hemmung auf die GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung, den Status von zytoplasmatischen Signalproteinen und die Zytokinsekretion untersucht. Stimulationsexperimente mit primären humanen Kolonepithelzellen sind relativ aufwendig, da diese nicht wie andere Zellpopulationen in Langzeitkultur gehalten werden können, sondern aufgrund des notwendigen Erhalts wichtiger Zellkontakte direkt nach Isolation stimuliert werden müssen und eine sehr begrenzte Lebensdauer besitzen.<sup>110</sup> Da für Stimulationsexperimente relativ viel Gewebe notwendig wäre und chirurgisches Material von CED-Patienten nur begrenzt zur Verfügung steht, wurden diese Untersuchungen mit der HT-29-Epithelzelllinie durchgeführt. Zelllinien sind nützliche Hilfsmittel für die *in-vitro* Untersuchung zellulärer und molekularer Prozesse. Allerdings können *in-vitro* Erkenntnisse nicht immer auf die *in-vivo* Situation übertragen werden.

Bei Inkubation der HT-29-Zellen mit LiCl wurde für die mit TNF und LPS stimulierten Ansätze eine deutlich erhöhte Phosphorylierung der GSK3- $\beta$  mittels Western Blot nachgewiesen. Dies lässt auf eine effektive Hemmung der GSK3- $\beta$  durch LiCl schließen. Im Gegensatz dazu lag die GSK3- $\beta$  nach Simulation einer Entzündungsreaktion mittels TNF im Vergleich zu basalen Bedingungen vermindert phosphoryliert vor, was auf eine höhere Enzym-Aktivität hindeutet. Unter entzündlichen Bedingungen ist der Effekt des LiCl somit sehr groß. Durch LiCl wird hierbei eine sehr effektive Inaktivierung der GSK3- $\beta$  durch Phosphorylierung bewirkt. Die MAP-Kinasen ERK und p38, die i.d.R. bei Entzündungsreaktionen aktiviert werden, lagen nach TNF-Stimulation vermindert in ihrer aktiven Form vor, während nach TNF- und LiCl-Koinkubation sehr starke Signale für aktives ERK und p38

nachgewiesen wurden. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB wurde durch Stimulation und GSK3- $\beta$ -Inhibition nicht beeinflusst. Nach Stimulation mit TNF oder LPS wurden leicht erhöhte Signale für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B beobachtet. Eine stärkere Induktion von NF- $\kappa$ B wurde nach Behandlung mit LiCl beobachtet. Besonders stark war dieser Effekt bei Ko-Stimulation von TNF oder LPS mit LiCl. Dies spiegelt sich auch in der Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 wider. Nach TNF-Stimulation waren die IL-8-Spiegel erhöht. Darüber hinaus waren sowohl der basale als auch der durch TNF und LPS induzierte IL-8 Spiegel bei (KO-) Stimulation mit LiCl signifikant erhöht. Die erhöhten IL-8-Spiegel sind möglicherweise Folge der Induktion von NF- $\kappa$ B nach LiCl-Kostimulation. Trotz einer effektiven Hemmung der GSK3- $\beta$  durch LiCl (Phosphorylierung) zeigten die HT-29-Zellen einen proinflammatorischen Phänotyp (Induktion von NF- $\kappa$ B, Aktivitätserhöhung der MAP-Kinasen ERK und p38, Induktion von IL-8). Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den Daten der GSK3- $\beta$ -Hemmung bei primären humanen CLPF (siehe 4.4), bei denen die GSK3- $\beta$ -Hemmung eine signifikante Verminderung der basalen bzw. induzierten pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 und der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur Folge hatte. Auch für LPMZ wurde vor Kurzem nach GSK3- $\beta$ -Hemmung eine Reduktion des proinflammatorischen Phänotyps über eine verminderte IL-6-Sekretion und eine erhöhte IL-10-Sekretion in primären LPMZ des menschlichen Darms und eine Verminderung von NF- $\kappa$ B in LPMZ aus dem Darm von Mäusen nachgewiesen.<sup>93</sup> Dieser Effekt einer IL-8-Erhöhung nach LiCl-Inkubation könnte natürlich durch eine Kontamination der LiCl-Probe durch bakterielle Bestandteile, wie LPS zustande kommen. Da jedoch eine reine LPS-Stimulation bei HT-29-Zellen kaum zu einem IL-8-Anstieg führte, ist dies unwahrscheinlich. Im Vergleich zu anderen Zellpopulationen scheint die GSK3- $\beta$  in Epithelzellen der HT-29-Zelllinie somit in grundlegend gegensätzlicher Weise Einfluss auf die Entzündungsreaktion zu nehmen. Ob dieser Effekt, der hier für eine Epithelzelllinie beobachtet wurde, auch auf primäre Epithelzellen zutrifft, bleibt unklar. Ähnliche kontroverse Effekte der GSK3- $\beta$  v.a. für Epithelzellen wurden in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen bereits in wenigen Veröffentlichungen beschrieben. Vines et al. konnte zeigen, dass eine Hemmung der GSK3- $\beta$  in primären humanen mikrovaskulären Endothelzellen die TNF-induzierte IL-6-Sekretion um den Faktor 2,6 potenziert. Darüber hinaus konnte er einen anti-inflammatorischen Effekt der aktiven Form der GSK3- $\beta$  nach induzierter Entzündung in Endothelzellen nachweisen.<sup>111</sup>

Ähnliche antiinflammatorische Effekte der aktiven und proinflammatorische Effekte der phosphorylierten Form der GSK3- $\beta$  wurden von Shen et al. in Kardiomyozyten nachgewiesen.<sup>112</sup> Farooqui et al. konnte ebenfalls einen kontroversen Effekt der GSK3- $\beta$  auf die Migration von Epithelzellen nachweisen. Hierbei zeigte er, dass eine Migration von Epithelzellen durch GSK3- $\beta$ -Inhibition verhindert wird.<sup>113</sup> Der gezeigte proinflammatorische Effekt einer GSK3- $\beta$ -Inhibition in HT-29-Zellen lässt sich somit durch eine grundsätzlich verschiedene Rolle der GSK3- $\beta$  in bestimmten Zellpopulationen wie Epithelzellen erklären. Es wäre nun sehr interessant, zu untersuchen, welchen Effekt eine GSK3- $\beta$ -Inhibition in primären Kolonepithelzellen zeigt.

Da die Aktivität von GSK3- $\beta$  über Stimulation von TLR-Rezeptoren moduliert werden kann<sup>85</sup>, wurde die Immunantwort und das Verhalten der GSK3- $\beta$  in primären humanen CLPF von Kontroll-Patienten bei Kontakt mit verschiedenen TLR-Liganden untersucht. Die Phosphorylierung der GSK3- $\beta$  war sowohl nach Stimulation mit Pam2CSK<sub>4</sub> (TLR2), LPS (TLR4), Flagellin (TLR5) und CpG (TLR9) als auch für den unstimulierten Ansatz konstant. Die durch Phosphorylierung modulierte Aktivität der GSK3- $\beta$  scheint durch Stimulation verschiedener TLRs nicht bzw. nur in sehr geringem Maße beeinflusst zu sein. Die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 war nach TLR2- und TLR9-Stimulation nur gering, nach TLR4- und TLR5-Stimulation jedoch stark erhöht. Obwohl hierbei die Anzahl der Experimente mit n=3 relativ gering war, ließ sich dennoch eine klare Tendenz der Zytokinantwort zeigen. Ähnliche Ergebnisse der Zytokinantwort nach TLR-Stimulation konnten Kurt-Jones et al. für embryonale Mausfibroblasten zeigen: Trotz des Nachweises einer gleichmäßigen Expression der einzelnen TLRs, wurde nach TLR2-Stimulation mit Pam2CSK<sub>4</sub> ein nur sehr geringer IL-6-Anstieg, nach TLR4-Stimulation mit LPS eine deutliche IL-6-Erhöhung gemessen.<sup>114</sup> In Übereinstimmung damit zeigt sich, dass die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in Fibroblasten bei Stimulation von verschiedenen TLR-Rezeptoren unterschiedlich intensiv ausfällt. Darüber hinaus führte die Stimulation mit LPS (TLR4) zu einer sehr hohen IL-6-Antwort, während die Stimulation mit Flagellin (TLR5) besonders hohe IL-8-Spiegel zur Folge hatte. Die Stimulation unterschiedlicher TLRs löst somit eine sehr differenzierte Zytokinsekretion aus. Um den proinflammatorischen Charakter einer TLR-Stimulation einschätzen zu können, ist es daher sinnvoll, die Sekretion von verschiedenen Zytokinen zu bestimmen.

Die Ser/Thr-Kinase GSK3- $\beta$  wurde vor kurzem als ein Regulator der TLR-vermittelten Immunantwort identifiziert.<sup>85</sup> Hofmann et al. konnten zudem zeigen, dass eine Blockierung der GSK3- $\beta$  mittels LiCl eine überschießende Immunreaktion intestinaler Immunzellen auf bakterielle Bestandteile hemmt.<sup>93</sup> Die Rolle der GSK3- $\beta$  für Entzündungsprozesse in mesenchymalen Zellen war jedoch bisher noch unklar. CLPF spielen eine entscheidende Rolle bei Immunreaktionen im menschlichen Darm. Vor allem für die Entzündungsreaktion und Wundheilung sind sie von entscheidender Bedeutung.<sup>4</sup>

In primären humanen CLPF aus Darmgewebe von Kontroll- und CED-Patienten konnte ebenfalls eine effektive Hemmung der GSK3- $\beta$  durch Phosphorylierung bei Behandlung mit LiCl nachgewiesen werden. TNF und LPS induzierten ebenso eine leichte GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung. Diese Beobachtung lässt sich für die LPS-Stimulation durch TLR-abhängige Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweg erklären. TLR-Stimulation führt über PI3K-Aktivierung zur Phosphorylierung und Aktivierung von Akt, welches GSK3- $\beta$  durch Phosphorylierung inaktiviert.<sup>85,92</sup> TNF hingegen ist ein endogenes Zytokin, durch das experimentell eine Entzündung induziert wird. Somit scheint es auch TLR-unabhängige Mechanismen zu geben, die eine GSK3- $\beta$ -Inaktivierung zur Folge haben. Eine GSK3- $\beta$ -Hemmung führt über die Regulation von Transkriptionsfaktoren zur Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine.<sup>85</sup> Es wurde nachgewiesen, dass eine TLR-abhängige Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweg zu einer Abnahme der Produktion von TNF und IL-12<sup>115,116</sup> und zu einer vermehrten IL-10-Bildung<sup>88</sup> führt. Die GSK3- $\beta$ -Inaktivierung nach Kontakt mit inflammatorischen Stimuli ist somit als eine anti-inflammatorische Rückkopplungsreaktion anzusehen, die vor einer übermäßigen Entzündungsreaktion schützt.<sup>80</sup> In MC-CLPF wurde nach TNF- und LPS-Stimulation eine erhöhte Aktivität der MAP-Kinase ERK beobachtet, nicht aber in Kontroll- und CU-CLPF. Einige MAP-Kinasen sind in der Lage, GSK3- $\beta$  zu phosphorylieren.<sup>97</sup> An der Induktion der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung in MC-CLPF nach Kontakt mit inflammatorischen Stimuli könnte daher möglicherweise ERK beteiligt sein. Da jedoch in CU- und Kontroll-CLPF ebenfalls eine Induktion der GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung aber keine erhöhte ERK-Aktivität beobachtet wurde, bleibt der Mechanismus der GSK3- $\beta$ -Inaktivierung nach TNF-Stimulation unklar.

Die Messung der basalen Zytokinspiegel von IL-6 und IL-8 zeigte relativ große Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass

es sich hierbei um primäre Zellen handelt, die aus chirurgischem Material von verschiedenen Patienten isoliert wurden. Vor der chirurgischen Intervention waren die Patienten individuell medikamentös behandelt. Auch der Entzündungsstatus war unterschiedlich ausgeprägt. Aus diesen Gründen reagierten die CLPF von verschiedenen Patienten auch in unterschiedlichem Maß auf inflammatorische Stimuli. Primäre humane Zellen bieten allerdings den großen Vorteil, dass die *in-vitro*-Beobachtung sehr genaue Rückschlüsse auf die tatsächlichen Vorgänge in der physiologischen Umgebung des menschlichen Darms zulassen.

Sowohl die basale als auch die induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wurde durch Hemmung der GSK3- $\beta$  mittels LiCl in Kontroll- und CED-CLPF vermindert. Die Effektivität und der Grad der Reduktion von IL-6 und IL-8 waren jedoch unterschiedlich für die einzelnen Zellen und für verschiedene Stimulationsbedingungen, es zeigten sich jedoch weitgehend ähnliche Tendenzen. Grundsätzlich war der reduktive Effekt einer GSK3- $\beta$ -Hemmung mittels LiCl für die IL-6-Sekretion deutlich stärker. Bei CU-CLPF war die Zytokinabnahme von IL-6 und IL-8 nach LiCl-(Ko-)Stimulation im Vergleich zu Kontroll- und MC-CLPF am geringsten. Den größten Effekt einer GSK3- $\beta$ -Blockierung wurde für MC-CLPF nachgewiesen. Hier waren sowohl die basale als auch die induzierte IL-6- und IL-8-Sekretion unter GSK3- $\beta$ -Hemmung sehr deutlich und signifikant reduziert. Eine Blockierung der GSK3- $\beta$  kann daher humane CLPF, in besonderem Maße MC-CLPF, vor einer übermäßigen Immunantwort auf inflammatorische Stimuli schützen. Es wurde somit nachgewiesen, dass GSK3- $\beta$  auch die TLR-vermittelte Immunreaktion von mesenchymalen Zellen des menschlichen Kolons reguliert. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen aus primären humanen LPMZ überein: Die Hemmung von GSK3- $\beta$  in primären humanen LPMZ aus entzündetem CED-Gewebe bewirkte eine signifikante Reduktion sowohl der basalen als auch der induzierten IL-6-Sekretion (siehe 4.1.4). Darüber hinaus scheint die GSK3- $\beta$  unabhängig von TLR-vermittelten Prozessen auch Einfluss auf weitere entzündliche Prozesse zu nehmen. Dies zeigte der Einfluss der GSK3- $\beta$ -Hemmung auf die TNF-induzierte Entzündungsreaktion in CLPF. GSK3- $\beta$  scheint somit grundsätzlich ein wichtiges Schlüsselprotein zu sein, das pro- und anti-inflammatorische Prozesse kontrollieren kann.

Um die GSK3- $\beta$ -abhängigen pro- und anti-inflammatorischen Effekte auf Transkriptionsebene weiter nachvollziehen zu können, wurde der Einfluss der GSK3-

$\beta$ -Hemmung auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB untersucht. NF- $\kappa$ B induziert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine<sup>117</sup>, während CREB für die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine verantwortlich ist<sup>118</sup>. Die Aktivität beider Transkriptionsfaktoren wird von GSK3- $\beta$  reguliert. Martin et al und Hofmann et al konnten zeigen, dass nach GSK3- $\beta$ -Hemmung die Aktivität von CREB erhöht und gleichzeitig die NF- $\kappa$ B-Aktivität vermindert wird.<sup>85,93</sup> Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung einer anti-inflammatorischen Zytokinsekretion (IL-10). Bei primären humanen CLPF konnte ebenfalls eine Abnahme sowohl der basalen als auch der durch LPS-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivität von jeweils ca. 30% gezeigt werden. Diese Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivität spiegelt sich im Rückgang der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 nach GSK3- $\beta$ -Hemmung wider und lässt insgesamt auf eine verminderte Entzündungsreaktion schließen. Anhand der bisherigen Ergebnisse und der Daten von Martin et al und Hofmann et al wäre nun ein Anstieg der CREB-Aktivität bei GSK3- $\beta$ -Inhibition zu erwarten gewesen. In primären humanen CLPF war jedoch die CREB-Aktivität nach GSK3- $\beta$ -Hemmung vermindert. Die Anzahl der Experimente mit DNA-Bindungsassays war zwar mit n=3 relativ gering, es zeigte sich aber einheitlich eine deutliche Abnahme der basalen CREB-Aktivität von ca. 30% und ein Rückgang der LPS-induzierten CREB-Aktivität von 50%. Die Aktivität von CREB könnte somit in primären humanen CLPF anders reguliert sein als bisher für LPMZ und Blutmonozyten gezeigt wurde. In Hinblick auf die CREB-Aktivität wäre es interessant, die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen nach GSK3- $\beta$ -Inhibition in CLPF zu untersuchen. Die IL-10-Konzentration von primären humanen CLPF lag jedoch in den Versuchen unter der Nachweisgrenze. Somit bleibt der Effekt der GSK3- $\beta$ -Hemmung auf anti-inflammatorische Faktoren in primären humanen CLPF noch recht unklar. Es konnte jedoch eine deutliche Reduktion der pro-inflammatorischen Faktoren nach GSK3- $\beta$ -Hemmung sowohl auf Transkriptions- als auch auf Zytokinebene nachgewiesen werden.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass GSK3- $\beta$  ein wichtiger Regulator sowohl TLR-abhängiger als auch TLR-unabhängiger Immunreaktionen in primären humanen CLPF ist. Durch Hemmung von GSK3- $\beta$  lassen sich pro-inflammatorische Prozesse in primären humanen CLPF gezielt modulieren.

Eine Blockierung der GSK3- $\beta$  könnte somit vor einer übermäßigen Entzündungsreaktion auch bei bereits vorbestehender chronisch-intestinaler



---

Entzündung schützen. Da die GSK3- $\beta$  jedoch an sehr vielen zellulären Prozessen und bei mehreren Erkrankungen beteiligt ist, müssten bei einer *in-vitro*-Behandlung die Vorteile und möglichen Gefahren grundlegend abgewogen werden. Falls es jedoch gelingt, GSK3- $\beta$ -abhängige Prozesse bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen noch genauer zu entschlüsseln und einen geeigneten Angriffspunkt für neue Therapien zu finden, könnten über eine medikamentöse Rekonstruktion der physiologischen Bedingungen im Darm möglicherweise neue Strategien zur Behandlung von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entwickelt werden.

## 6 Zusammenfassung

Sowohl die Ätiologie als auch die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind bisher nicht hinreichend geklärt. Für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten dieser chronischen Krankheiten ist jedoch die genaue Kenntnis des chronischen Entzündungszustandes wichtig. Eine fehlregulierte TLR-Signaltransduktion scheint entscheidend für die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündungsreaktion zu sein. Welche Signalmoleküle des TLR-Signalwegs unter chronisch entzündeten Bedingungen verändert aktiviert sind, ist bisher jedoch nicht bekannt. GSK3- $\beta$  wurde kürzlich als ein möglicher Regulator der TLR-abhängigen Signaltransduktion beschrieben. Die Aktivität dieses Enzyms fördert pro-inflammatorische Immunantworten in Blutmonozyten, während anti-inflammatorische Mechanismen blockiert werden. Die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass die Hemmung von GSK3- $\beta$  mittels LiCl auch überschießende TLR-vermittelte Immunantworten intestinaler Immunzellen auf bakterielle Bestandteile blockiert. Die Rolle von GSK3- $\beta$  für Entzündungsprozesse in mesenchymalen Zellen ist bisher jedoch noch unklar.

Im Hauptteil dieser Arbeit wurde daher der Effekt der GSK3- $\beta$ -Blockierung auf die Funktion von Kolon Lamina propria Fibroblasten (CLPF) aus Gewebe von Kontroll- und CED-Patienten untersucht. In zusätzlichen Versuchen wurde der basale Protein- und Phosphorylierungsstatus der GSK3- $\beta$  in Gesamtgewebe und in bestimmten Zellpopulationen des menschlichen Darms von Kontroll-, MC- und CU-Patienten bestimmt, der Effekt einer GSK3- $\beta$ -Inhibition hinsichtlich entzündlicher Prozesse in Epithelzellen der HT-29-Epithelzelllinie getestet und der GSK3- $\beta$ -Status sowie die Sekretion bestimmter Zytokine von CLPF nach Kontakt mit Liganden verschiedener TLR-Rezeptoren ermittelt.

Um diese Fragestellung zu klären wurden CLPF aus chirurgischem Material oder aus Biopsien von Kontroll- und CED-Patienten isoliert. Nach Stimulation der CLPF mit TNF oder LPS in An- und Abwesenheit des GSK3- $\beta$ -Inhibitors LiCl erfolgte die quantitative Bestimmung der IL-6- und IL-8-Konzentrationen in den Überständen mittels ELISA. Die GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung und der Status weiterer zytoplasmatischer Proteine wurde jeweils in Zelllysaten mittels Western Blot bestimmt. Des weiteren wurden aus stimulierten CLPF Zellkernextrakte gewonnen und mittels DNA-Bindungsassays die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und

CREB bestimmt. Dieselben Methoden wurden für die Versuche mit HT-29-Zellen und für die CLPF-Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden angewendet.

Der Proteinstatus und die Phosphorylierung von GSK3- $\beta$  in primärem Kolon-Gewebe sowie in bestimmten primären Zellpopulationen des menschlichen Darms von Kontroll- und CED-Patienten ergab keine einheitliche Tendenz.

In HT-29-Zellen führte eine Blockierung der GSK3- $\beta$  mittels LiCl sowohl basal als auch bei Kostimulation mit TNF oder LPS zu einer signifikant erhöhten IL-8-Sekretion. Nach TNF- und LiCl-Kostimulation waren auch die proinflammatorischen Parameter NF- $\kappa$ B, pERK und phospho-p38 erhöht. Die GSK3- $\beta$  scheint daher in Epithelzellen der HT-29-Zelllinie in grundlegend anderer Weise Einfluss auf die Entzündungsreaktion zu nehmen als in den meisten bisher untersuchten Zellpopulationen.

Der Phosphorylierungsgrad der GSK3- $\beta$  in primären humanen CLPF wurde durch verschiedenen TLR-Liganden nicht beeinflusst. Trotzdem zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der Zytokinsekretion von IL-6 und IL-8.

Die *in vitro* LiCl-Behandlung von primären humanen CLPF führte zu einer deutlich erhöhten GSK3- $\beta$ -Phosphorylierung, was auf eine effektive Hemmung des Enzyms hindeutet. Die GSK3- $\beta$ -Inhibition bewirkte eine Reduktion der basalen und induzierten IL-6- und IL-8-Sekretion von Kontroll- und CED-Zellen, jedoch in unterschiedlicher Effektivität. Den deutlich stärkeren reduktiven Effekt hatte die GSK3- $\beta$ -Hemmung auf die Sekretion von IL-6. CLPF von MC-Patienten zeigten nach GSK3- $\beta$ -Inhibition im Vergleich zu Kontroll- und CU-CLPF für alle Stimulationsbedingungen eine sehr viel ausgeprägtere IL-6- und IL-8-Reduktion. Eine Hemmung der GSK3- $\beta$  scheint also besonders bei MC-CLPF einen protektiven Effekt vor einer übermäßigen Immunreaktion bei Kontakt mit inflammatorischen Stimuli zu bieten. Sowohl die basale als auch die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivität war in Gegenwart von LiCl vermindert, wodurch der Rückgang der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion erklärt werden kann.

Die Hemmung von GSK3- $\beta$  zeigt somit anti-inflammatorische Effekte auf CLPF aus Kontroll und CED-Gewebe. GSK3- $\beta$  scheint daher nicht nur ein zentraler Regulator TLR-vermittelter Immunantworten in intestinalen Immunzellen zu sein, sondern auch bestimmte entzündliche Prozesse in mesenchymalen Zellen wie CLPF zu modulieren.

# Anhang

## Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Welsch U (2006) Sobotta Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie; mit 21 Tabellen. München: Urban & Fischer in Elsevier.
- <sup>2</sup> Feldman M (1996) Gastroenterology and hepatology. The comprehensive visual reference. New York, NY: Churchill Livingstone.
- <sup>3</sup> Sturm A, Dignass AU (2008) Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 14:348–353.
- <sup>4</sup> Andoh A, Bamba S, Brittan M, Fujiyama Y, Wright NA (2007) Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacology & therapeutics* 114:94–106.
- <sup>5</sup> Dale PD, Sherratt JA, Maini PK (1997) Role of fibroblast migration in collagen fiber formation during fetal and adult dermal wound healing. *Bulletin of mathematical biology* 59:1077–1100.
- <sup>6</sup> Hinz B, Gabbiani G (2003) Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thrombosis and haemostasis* 90:993–1002.
- <sup>7</sup> Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Göke M, Schölmerich J, Gelbmann CM, Rogler G (2003) Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology* 125:1341–1354.
- <sup>8</sup> Rogler G, Gelbmann CM, Vogl D, Brunner M, Schölmerich J, Falk W, Andus T, Brand K (2001) Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures. *Scandinavian journal of gastroenterology* 36:389–398.
- <sup>9</sup> Wittig BM, Zeitz M (2003) The gut as an organ of immunology. *International journal of colorectal disease* 18:181–187.
- <sup>10</sup> Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599–603.
- <sup>11</sup> Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603–606.
- <sup>12</sup> Hugot JP, Zouali H, Lesage S (2003) Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. *European journal of gastroenterology & hepatology* 15:593–597.
- <sup>13</sup> Török HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, Klein W, Lohse P, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Göke B, Folwaczny C, Müller-Myhsok B, Brand S (2009) Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* 104:1723–1733.
- <sup>14</sup> Wellcome Trust Case Control Consortium, Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S, Vukcevic D, Barnes C, Conrad DF, Giannoulatou E, Holmes C, Marchini JL, Stirrups K, Tobin MD, Wain LV, Yau C et al (2011) Genome-wide association study of CNVs in 16,000 case of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 464:713–720.
- <sup>15</sup> Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, Lee JC, Goyette P, Imielinski M, Latiano A, Lagacé C, Scott R et al (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature genetics* 43:246–252.
- <sup>16</sup> Podolsky DKM (2002) Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine* 347:417–429.
- <sup>17</sup> Tobin MV LRLMMRGI (1987) Cigarette smoking and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 93:316–321.
- <sup>18</sup> Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, Beaugerie L, Cattan S, Gendre J (1999) Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 13:1403–1411.
- <sup>19</sup> Jick H WA (1983) Cigarette smoking and ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine* 308:261–263.
- <sup>20</sup> Greten H, Andrassy K (2005) Innere Medizin. Verstehen, lernen, anwenden. Stuttgart: G. Thieme.

- <sup>21</sup> Siegenthaler W (2005) Siegenthalers Differenzialdiagnose. Innere Krankheiten - vom Symptom zur Diagnose. Stuttgart: G. Thieme.
- <sup>22</sup> Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, JR (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394–397.
- <sup>23</sup> Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428–435.
- <sup>24</sup> Takeda K, Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 17:1–14.
- <sup>25</sup> Yamamoto M, Takeda K (2010) Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterology research and practice* 2010:240365.
- <sup>26</sup> Bowie A, La O'Neill (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology* 67:508–514.
- <sup>27</sup> Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, Kuroki Y (2007) Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC genomics* 8:124.
- <sup>28</sup> Aliprantis AO, Yang RB, Mark, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736–739.
- <sup>29</sup> Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of biological chemistry* 274:17406–17409.
- <sup>30</sup> Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ (1999) Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology* 163:3920–3927.
- <sup>31</sup> Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167:416–423.
- <sup>32</sup> Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB (2001) Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulins. *Journal of immunology* 166:15–19.
- <sup>33</sup> Underhill DM, Ozinsky A, Am Hajjar, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811–815.
- <sup>34</sup> Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT, Wetzler LM (2002) Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *Journal of immunology* 168:1533–1537.
- <sup>35</sup> Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335–376.
- <sup>36</sup> Zähringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C (2008) TLR2 – promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* 213:205–224.
- <sup>37</sup> Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology* 13:933–940.
- <sup>38</sup> Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of immunology* 169:10–14.
- <sup>39</sup> Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR (2000) Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. *J. Immunol.* 165:3541–3544.
- <sup>40</sup> Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3:667–672.
- <sup>41</sup> Viriyakosol S, Kirkland T, Soldau K, Tobias P (2000) MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of endotoxin research* 6:489–491.
- <sup>42</sup> Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss J3 (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *The Journal of biological chemistry* 276:10229–10233.
- <sup>43</sup> Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC (2002) Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine* 195:99–111.
- <sup>44</sup> Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *Journal of immunology* 164:558–561.

- <sup>45</sup> Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H (2002) HSP70 as Endogenous Stimulus of the Toll/Interleukin-1 Receptor Signal Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277:15107–15112.
- <sup>46</sup> Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial Flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099–1103.
- <sup>47</sup> Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL (2001) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *Journal of immunology* 167:1882–1885.
- <sup>48</sup> Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740–745.
- <sup>49</sup> Krieg AM (2000) Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* 19:618–622.
- <sup>50</sup> Rakoff-Nahoum S, Bousvaros A (2010) Innate and adaptive immune connections in inflammatory bowel diseases. *Current Opinion in Gastroenterology* 26:572–577.
- <sup>51</sup> Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312:1355–1359.
- <sup>52</sup> Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual review of immunology* 20:495–549.
- <sup>53</sup> Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, Veltkamp C, Godfrey VL, Kwon J, Grenther WB, Balish E, Horak I, Sartor RB (1999) IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *The American journal of physiology* 276:G1461–72.
- <sup>54</sup> Karrasch T, Kim JS, Muhlbauer M, Magness ST, Jobin C (2007) Gnotobiotic IL-10-/-;NF-κB(EGFP) mice reveal the critical role of TLR/NF-κB signaling in commensal bacterial-induced colitis. *J Immunol* 178:6522–6532.
- <sup>55</sup> Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G (2010) IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflammatory bowel diseases* 16:1808–1813.
- <sup>56</sup> Izcue A, Hue S, Buonocore S, Arancibia-Cárcamo CV, Ahern PP, Iwakura Y, Maloy KJ, Powrie F (2008) Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 28:559–570.
- <sup>57</sup> Lecat A, Piette J, Legrand-Poels S (2010) The protein Nod2: an innate receptor more complex than previously assumed. *Biochemical pharmacology* 80:2021–2031.
- <sup>58</sup> Bleich A, Janus LM, Smoczek A, Westendorf AM, Strauch U, Mähler M, Hedrich H, Fichtner-Feigl S, Schölmerich J, Falk W, Hofmann C, Obermeier F (2009) CpG Motifs of Bacterial DNA Exert Protective Effects in Mouse Models of IBD by Antigen-Independent Tolerance Induction. *Gastroenterology* 136:278–287.
- <sup>59</sup> Katakura K, Lee J, Rachmilewitz D, Li G, Eckmann L, Raz E (2005) Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *The Journal of clinical investigation* 115:695–702.
- <sup>60</sup> Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Grunwald N, Herfarth H, Schölmerich J, Falk W (2003) Contrasting activity of cytosin-guanosin dinucleotide oligonucleotides in mice with experimental colitis. *Clinical and experimental immunology* 134:217–224.
- <sup>61</sup> Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, Hedrich HJ, Aschenbrenner E, Schlegelberger B, Rogler G, Schölmerich J, Falk W (2005) CpG Motifs of Bacterial DNA Essentially Contribute to the Perpetuation of Chronic Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* 129:913–927.
- <sup>62</sup> Obermeier F, Hofmann C, Falk W (2010) Inflammatory Bowel Diseases: When Natural Friends Turn into Enemies—The Importance of CpG Motifs of Bacterial DNA in Intestinal Homeostasis and Chronic Intestinal Inflammation. *International Journal of Inflammation* 2010:1–5.
- <sup>63</sup> Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, an Rucker, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocaru G, Shenouda S, Kagnoff M, Eckmann L, Ben-Neriah Y, Raz E (2006) Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature cell biology* 8:1327–1336.
- <sup>64</sup> Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in biochemical sciences* 29:95–102.
- <sup>65</sup> Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *The EMBO journal* 9:2431–2438.
- <sup>66</sup> Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett, JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3β in cell survival and NF-κappaB activation. *Nature* 406:86–90.
- <sup>67</sup> Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (2007) Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochem Res* 32:577–595.
- <sup>68</sup> Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3β in cellular signaling. *Progress in neurobiology* 65:391–426.

- <sup>69</sup> Bijur GN, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14:2415–2419.
- <sup>70</sup> ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J (2001) Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nature structural biology* 8:593–596.
- <sup>71</sup> Eldar-Finkelman H, Schreyer SA, Shinohara MM, LeBoeuf RC, Krebs EG (1999) Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes* 48:1662–1666.
- <sup>72</sup> Semiz S, Orvig C, McNeill JH (2002) Effects of diabetes, vanadium, and insulin on glycogen synthase activation in Wistar rats. *Molecular and cellular biochemistry* 231:23–35.
- <sup>73</sup> Sarno P de, Axtell RC, Raman C, Roth KA, Alessi, Jope RS (2008) Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 181:338–345.
- <sup>74</sup> Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423:435–439.
- <sup>75</sup> Sun X, Sato S, Murayama O, Murayama M, Park JM, Yamaguchi H, Takashima A (2002) Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. *Neuroscience letters* 321:61–64.
- <sup>76</sup> Li X, Liu M, Cai Z, Wang G (2010) Regulation of glycogen synthase kinase-3 during bipolar mania treatment. *Bipolar disorders* 12:741–752.
- <sup>77</sup> Cuzzocrea S, Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, Muià C, Collin M, Esposito E, Bramanti P, Thiernemann C (2006) Glycogen synthase kinase-3 beta inhibition reduces secondary damage in experimental spinal cord trauma. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318:79–89.
- <sup>78</sup> Leis H, Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Paramio JM (2002) Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis. *Molecular carcinogenesis* 35:180–185.
- <sup>79</sup> Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Muià C, Crisafulli C, Dugo L, Collin M, Britti D, Caputi AP, Thiernemann C (2006) Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clinical immunology* 120:57–67.
- <sup>80</sup> Hu X, Paik PK, Chen J, Yarinina A, Kockeritz L, Lu TT, Woodgett, JR, Ivashkiv LB (2006) IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24:563–574.
- <sup>81</sup> Whittle BJ, Varga C, Pósa A, Molnár A, Collin M, Thiernemann C (2006) Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta. *British journal of pharmacology* 147:575–582.
- <sup>82</sup> Gao HK, Yin Z, Zhou N, Feng XY, Gao F, Wang HC (2008) Glycogen synthase kinase 3 inhibition protects the heart from acute ischemia-reperfusion injury via inhibition of inflammation and apoptosis. *Journal of cardiovascular pharmacology* 52:286–292.
- <sup>83</sup> Wang Y, Huang WC, Wang CY, Tsai CC, Chen CL, Chang YT, Kai JI, Lin CF (2009) Inhibiting glycogen synthase kinase-3 reduces endotoxaemic acute renal failure by down-regulating inflammation and renal cell apoptosis. *British journal of pharmacology* 157:1004–1013.
- <sup>84</sup> Zhu M, Tian D, Li J, Ma Y, Wang Y, Wu R (2007) Glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin are involved in the injury and repair of bronchial epithelial cells induced by scratching. *Experimental and molecular pathology* 83:30–38.
- <sup>85</sup> Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM (2005) Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nature immunology* 6:777–784.
- <sup>86</sup> Watcharasit P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *The Journal of biological chemistry* 278:48872–48879.
- <sup>87</sup> Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655–1657.
- <sup>88</sup> Martin M, Schifferle RE, Cuesta N, Vogel SN, Katz J, Michalek SM (2003) Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Journal of immunology* 171:717–725.
- <sup>89</sup> Toker A, Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387:673–676.
- <sup>90</sup> Lawlor MA, Alessi (2001) PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of cell science* 114:2903–2910.
- <sup>91</sup> Franke TF, Kaplan, Cantley LC, Toker A (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665–668.
- <sup>92</sup> Cross DA, Alessi, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785–789.

- 
- <sup>93</sup> Hofmann C, Dunger N, Schölmerich J, Falk W, Obermeier F (2010) Glycogen synthase kinase 3-beta: a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases* 16:1850–1858.
- <sup>94</sup> Nelson WJ, Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483–1487.
- <sup>95</sup> Doble BW, Woodgett, JR (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of cell science* 116:1175–1186.
- <sup>96</sup> Jin T, George FI, Sun J (2008) Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cellular signalling* 20:1697–1704.
- <sup>97</sup> Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *The Biochemical journal* 359:1–16.
- <sup>98</sup> Weston CR, Lambright DG, Davis RJ (2002) Signal transduction. MAP kinase signaling specificity. *Science* 296:2345–2347.
- <sup>99</sup> Stambolic V, Ruel L, Woodgett, JR (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Current biology* 6:1664–1668.
- <sup>100</sup> Kunick C, Lauenroth K, Leost M, Meijer L, Lemcke T (2004) 1-Azakenpauellone is a selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3 beta. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 14:413–416.
- <sup>101</sup> Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P (2003) GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chemistry & biology* 10:1255–1266.
- <sup>102</sup> Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *Journal of neurochemistry* 77:94–102.
- <sup>103</sup> Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:8455–8459.
- <sup>104</sup> Jope RS (2003) Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends in pharmacological sciences* 24:441–443.
- <sup>105</sup> Sarno P de, Li X, Jope RS (2002) Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology* 43:1158–1164.
- <sup>106</sup> Zhong H, Voll RE, Ghosh S (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Molecular cell* 1:661–671.
- <sup>107</sup> Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy (1996) Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Molecular and cellular biology* 16:694–703.
- <sup>108</sup> Parry GC, Mackman N (1997) Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription. *Journal of immunology* 159:5450–5456.
- <sup>109</sup> Grimes CA, Jope RS (2001) CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *Journal of neurochemistry* 78:1219–1232.
- <sup>110</sup> Hofmann C, Lippert E, Falk W, Schölmerich J, Rogler G, Obermeier F (2009) Primary human colonic epithelial cells are transiently protected from anoikis by a Src-dependent mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* 390:908–914.
- <sup>111</sup> Vines A, Cahoon S, Goldberg I, Saxena U, Pillarisetti S (2006) Novel Anti-inflammatory Role for Glycogen Synthase Kinase-3beta in the Inhibition of Tumor Necrosis Factor-alpha- and Interleukin-1beta-induced Inflammatory Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 281:16985–16990.
- <sup>112</sup> Shen E, Fan J, Peng T (2008) Glycogen synthase kinase-3beta suppresses tumor necrosis factor-alpha expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation. *J. Cell. Biochem* 104:329–338.
- <sup>113</sup> Farooqui R, Zhu S, Fenteany G (2006) Glycogen synthase kinase-3 acts upstream of ADP-ribosylation factor 6 and Rac1 to regulate epithelial cell migration. *Experimental Cell Research* 312:1514–1525.
- <sup>114</sup> Kurt-Jones EA, Sandor F, Ortiz Y, Bowen GN, Counter SL, Wang TC, Finberg RW (2004) Use of murine embryonic fibroblasts to define Toll-like receptor activation and specificity. *Journal of Endotoxin Research* 10:419–424.
- <sup>115</sup> Guha M, Mackman N (2002) The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway Limits Lipopolysaccharide Activation of Signaling Pathways and Expression of Inflammatory Mediators in Human Monocytic Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:32124–32132.



- 
- <sup>116</sup> Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, Koyasu S (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat. Immunol* 3:875–881.
- <sup>117</sup> Blackwell TS, Christman JW (1997) The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17:3–9.
- <sup>118</sup> Platzer C, Fritsch E, Elsner T, Lehmann MH, Volk HD, Prösch S (1999) Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol* 29:3098–3104.

---

## Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Posterbeiträge und Vorträge auf wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt. Im Folgenden sind die Titel dieser Publikationen aufgelistet:

### Posterbeiträge

**R. Mayr**, I. Fink, J. Schölmerich, W. Falk, F. Obermeier, C. Hofmann. GSK3- $\beta$  ist ein Modulator inflammatorischer und fibrotischer Prozesse in primären humanen Kolonfibroblasten. *116.Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), Wiesbaden (2010)*

**R. Mayr**, I. Fink, J. Schölmerich, W. Falk, F. Obermeier, C. Hofmann. GSK3- $\beta$  ist ein Modulator inflammatorischer und fibrotischer Prozesse in primären humanen Kolonfibroblasten. *65.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Stuttgart (2010)*

**R. Mayr**, I. Fink, J. Schölmerich, W. Falk, F. Obermeier, C. Hofmann. GSK3- $\beta$  is a modulator of distinct inflammatory and fibrotic processes in primary human colonic fibroblasts. *1. Jahrestagung der Gesellschaft für Mukosale Immunologie und Mikrobiom (DGMIM), Stuttgart (2010)*

### Vorträge

**R. Mayr**, I. Fink, J. Schölmerich, W. Falk, F. Obermeier, C. Hofmann. GSK3- $\beta$  is a modulator of distinct inflammatory and fibrotic processes in primary human colonic fibroblasts. *Digestive Disease Week (DDW), New Orleans (2010)*

**R. Mayr**, I. Fink, J. Schölmerich, W. Falk, F. Obermeier, C. Hofmann. GSK3- $\beta$  ist ein Modulator inflammatorischer und fibrotischer Prozesse in primären humanen Kolonfibroblasten. *Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (DACED), Mainz (2010)*

**R. Mayr**, I. Fink, J. Schölmerich, W. Falk, F. Obermeier, C. Hofmann. GSK3- $\beta$  is a modulator of distinct inflammatory and fibrotic processes in primary human colonic fibroblasts. *1. Jahrestagung der Gesellschaft für Mukosale Immunologie und Mikrobiom (DGMIM), Stuttgart (2010)*

---

## Preis

Forschungspreis (2. Platz)

*Deutsche Gesellschaft für Mukosale Immunologie und Mikrobiom (DGMIM)*

*im Rahmen der 1. Jahrestagung, 15-16.10.2010*

GSK3- $\beta$  is a modulator of distinct inflammatory and fibrotic processes in primary human colonic fibroblasts

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Bedanken, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Voran gilt mein Dank der Lehrstuhlinhaberin Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling (und Ihrem Vorgänger Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich) für die Ermöglichung der Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I sowie für die Förderung experimenteller Doktorarbeiten.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Florian Obermeier für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie für das große Interesse am Gelingen der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Claudia Kunst (geb. Hofmann) für die in jeder Hinsicht sehr gute Betreuung meiner Arbeit, für die vielen wertvollen wissenschaftlichen Tipps sowie für die Möglichkeit, meine Arbeit auf mehreren Kongressen vorzustellen.

Bedanken möchte ich mich bei den Ärzten der Endoskopie, der Viszeralchirurgie und der Pathologie für die gute Kooperation mit der Arbeitsgruppe A3 und für das Überlassen von Biopsien und chirurgischem Material zur Gewinnung primärer Zellen.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe A3 sowie des Forschungsbaus H1 möchte ich mich für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken. Mein spezieller Dank geht hierbei an Manuela Stiber-Gunckel, Irina Fink, Massimiliano Caioni, Nadja Dunger, Nicole Grünwald, Andrea Dirmeier, Rita Brunner-Ploss, Dr. Phillip Groß und Dr. Jessica Bauer sowie an meine medizinischen Mitdoktoranden Stefan Loose, Margareta Manka, Sebastian Siller und Sebastian Zundler.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die großartige Unterstützung und den großen Rückhalt in jeglicher Hinsicht während meines Studiums und während dieser Arbeit bedanken.

---

Ganz besonders möchte ich meinem Freund Franz danken für die große Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit, fürs die zahlreichen Tipps und Anregungen, fürs Korrekturlesen und darüberhinaus für den tollen Rückhalt.

---

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Regensburg, den

.....  
Rebecca Mayr